

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-502082

(43) 公表日 平成8年(1996)3月5日

(51) Int.Cl.⁶

C 0 8 B 37/00

A 6 1 K 38/00

38/21

識別記号

Z 7433-4C

9455-4C

9455-4C

審査請求 未請求

A 6 1 K 37/02

37/24

予備審査請求 有

(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-503427
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)7月1日
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)12月27日
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/06292
 (87) 国際公開番号 WO94/01483
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)1月20日
 (31) 優先権主張番号 07/907, 518
 (32) 優先日 1992年7月2日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 07/922, 541
 (32) 優先日 1992年7月30日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 コラーゲン コーポレイション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303,
 バロ アルト, フェイバー プレイス
 2500
 (72) 発明者 リー, ウーンザ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306,
 バロ アルト, ラ ドンナ アベニュー
 3845
 (72) 発明者 ウォレス, ドナルド ジー,
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025,
 メンロ パーク, リングウッド アベニュー
 290
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体適合性ポリマー結合体

(57) 【要約】

生物学的に不活性な天然ポリマーまたはその誘導体と、
 薬学的に純粋な親水性合成ポリマーとを、特定のタイプの
 の化学的結合を介して共有結合させることによって、薬
 学的に受容可能な、非免疫原性の結合体が形成される。
 この生体適合性結合体は軟組織の増強、および種々の物
 品のコーティングまたは形成のために使用され得る。こ
 の親水性合成ポリマーは、約100から約100,000の範囲に
 わたる重量平均分子量を有するポリエチレングリコール
 およびその誘導体であり得る。この組成物は、他の成
 分、例えば、注入可能な処方物のための薬学的に受容可
 能な液体キャリア、および/または、増殖因子またはサ
 イトカインのような生物学的活性タンパク質を含み得
 る。この結合体は一般に、形成されたときには多量の水
 を含み、そして脱水されて固い目的物を形成し得、これ
 は次に、粒子状に粉碎され得、そしては乳剤への注入の
 ために非水性流体中に懸濁され、軟組織の増強を提供す
 る。

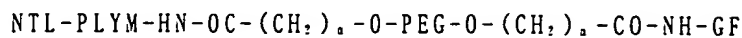
【特許請求の範囲】

1. エーテル結合により親水性合成ポリマーと化学的に結合した天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、生体適合性の生物学的に不活性な結合体。
2. 前記天然ポリマーまたはそれらの誘導体がグリコサミノグリカンおよびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項1に記載の結合体。
3. 前記グリコサミノグリカンまたはそれらの誘導体が、コンドロイチン硫酸A(4-スルフェート)、コンドロイチン硫酸C(6-スルフェート)、デルマトン硫酸(コンドロイチン硫酸B)、ヒアルロン酸、およびそれらの誘導体からなる群から選択される、請求項2に記載の結合体。
4. 前記天然ポリマーが、ヒアルロン酸およびデキストランからなる群から選択される多糖類である、請求項2に記載の結合体。
5. 前記多糖類が、ヒドロキシセルロース、セルロースエーテル、デンプン、およびシクロデキストリンからなる群から選択されるデキストランである、請求項4に記載の結合体。
6. 前記天然ポリマーがコラーゲンまたはそれらの誘導体である、請求項1に記載の結合体。
7. 前記コラーゲンが、再構成されたアテロペプチド繊維性コラーゲンおよびテロペプチド含有繊維性コラーゲンからなる群から選択される、請求項6に記載の結合体。
8. 前記親水性合成ポリマーが、二官能性活性化ポリエチレングリコールおよび多官能性活性化ポリエチレングリコールからなる群から選択される、請求項1に記載の結合体。
9. エーテル結合により親水性合成ポリマーと化学的に結合した天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、生体適合性の生物学的に不活性な結合体；および、
治療に有効な量のサイトカインまたは増殖因子を含有する組成物。
10. 前記サイトカインまたは増殖因子が、上皮増殖因子、形質転換増殖因子 α 、形質転換増殖因子 β 、形質転換増殖因子 $\beta 2$ 、血小板由来増殖因子AA、血

血小板由来増殖因子A B、血小板由来増殖因子B B、酸性線維芽細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、結合組織活性化ペプチド、 β トロンボグロブリン、インシュリン様増殖因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、エリスロポエチン、神経成長因子、インターフェロン、骨形態形成タンパク質、および骨形成因子からなる群から選択され、そして、

前記親水性合成ポリマーが、二官能性活性化ポリエチレングリコールである、請求項9に記載の組成物。

1 1. 以下の一般構造式を有する、請求項9に記載の組成物：



ここで、nは、0、1、2、3、または4からなる群から選

択される整数であり、NTL-PLYMは、天然ポリマーまたはそれらの誘導体であり、PEGは、ポリエチレングリコールであり、そしてGFは、増殖因子またはサイトカインである。

1 2. 流動可能で、注入可能で、薬学的に受容可能な組成物であって、

エーテル結合により非免疫原性親水性合成ポリマーと化学的に結合した不活性な天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、生体適合性結合体；および、

該結合体を含有する組成物を流動可能および注入可能にするのに十分な量の薬学的に受容可能な流動性キャリアを含有する、組成物。

1 3. 骨欠損を修復するために好適な組成物であって、

エーテル結合により親水性合成ポリマーと化学的に結合した、不活性で、生物学的に不活性な天然ポリマーまたはそれらの誘導体；

適切な微粒子状材料；および、

十分な量の薬学的に受容可能な流動性キャリア；を含有する、組成物。

1 4. 請求項13に記載の組成物であって、

前記天然ポリマーがコラーゲンおよびグリコサミノグリカンからなる群から選択され、

前記適切な微粒子状材料が、繊維性架橋アテロペプチドコラーゲン、ゼラチンビーズ、ポリテトラフルオロエチレンビーズ、シリコーンゴムビーズ、ヒドロゲ

ルビーズ、炭化ケイ

素ビーズ、ガラスビーズ、ヒドロキシアパタイト粒子、リン酸三カルシウム粒子、またはヒドロキシアパタイトとリン酸三カルシウム粒子との混合物からなる群から選択される、組成物。

15. 請求項13に記載の組成物であって、

前記好適な微粒子状材料が、直径約20～250ミクロンの平均直径を有する、ヒドロキシアパタイト粒子、リン酸三カルシウム粒子、またはヒドロキシアパタイトとリン酸三カルシウム粒子との混合物からなる群から選択される、組成物。

16. 以下の工程を包含する、哺乳類の組織を増強する方法：

天然ポリマーまたはそれらの誘導体の水性混合物を得る工程；

該天然ポリマーとインサイチュで共有エーテル結合を形成し得る反応基を有する、非免疫原性親水性合成ポリマーの水性組成物を得る工程；

該天然ポリマー混合物と該合成ポリマー組成物とを混合して、反応混合物を形成する工程；および、

該天然ポリマーと該合成ポリマーとの間で実質的架橋が起こる前に、該反応混合物を、増強を必要とする部位に投与する工程。

17. 約0.10mmから約20mmの範囲の直径を有する糸状物であって、

共有結合により非免疫原性親水性ポリマーと化学的に結合

した、天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、糸状物。

18. 請求項17に記載の糸状物であって、

脱水され、丸状断面を有し、長く、固い円柱形状を有し、そして0.25mmから約2.5mmの範囲の直径を有する、糸状物。

19. 請求項18に記載の糸状物であって、フレキシブルであり、そして前記共有結合が、エステル結合、ウレタン結合、およびエーテル結合からなる群から選択される、糸状物。

20. 約0.25mmから約5.0cmの範囲の外径を有し、かつ0.05m

mから4.95cmの範囲の内径を有するチューブであって、

共有結合により非免疫原性親水性ポリマーと化学的に結合した、天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、チューブ。

21. 脱水された、請求項20に記載のチューブ。

22. 丸状断面を有する、請求項20に記載のチューブ。

23. 約10mmより長い、請求項20に記載のチューブ。

24. 10cmより長く、かつフレキシブルな、請求項20に記載のチューブであって；

前記共有結合が、エステル結合、ウレタン結合、およびエーテル結合からなる群から選択され；そして

前記親水性合成ポリマーが二官能性活性化ポリエチレングリコールであり、前記天然ポリマーがコラーゲンまたはそれ

らの誘導体である、チューブ。

25. 流動可能で、注入可能で、薬学的に受容可能な組成物であって、

非免疫原性親水性合成ポリマーと化学的に結合した天然ポリマーまたはそれらの誘導体を含有する、生体適合性結合体；および、

該結合体を含有する組成物を流動可能および注入可能にするのに十分な量の薬学的に受容可能な流動性キャリアを含有する、組成物。

26. 請求項1から8のいずれかに記載の結合体で表面がコートされた、固体物品

27. 前記物品が多孔質表面を有する骨移植片である、請求項26に記載の物品。

【発明の詳細な説明】

生体適合性ポリマー結合体

技術分野

本発明は、2種またはそれ以上のポリマー同士の共有結合によって形成された生体適合性結合体、特に、天然に存在するポリマーまたはそれらの誘導体と親水性合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））との結合によって形成された結合体、ならびに、この結合体を含有する組成物、成分、および移植片に関する。

発明の背景

天然に存在するが生物学的に不活性なポリマーが、多数知られている。このような例には、コラーゲンおよび多様なグリコサミノグリカン（例えば、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、キチン、およびヘパリン）が含まれる。これらのポリマーの誘導体も、生成され、ある誘導体は、医療用途のために処方されている。生物学的に不活性な合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））もまた多数知られている。多様な天然ポリマーと合成ポリマーとの組み合わせは、多様な医療用途において用いるための広範囲の特性を与える。本発明者らは、天然ポリマーと合成ポリマーとの特性を組み合わせた、新しくそして有用な結合体を発明し、そして、これらの結合体を、特に上記特性の利点を生かせる医療用組成

物、成分、および移植片に適用した。

発明の要旨

結合体は、天然に存在する生物学的に不活性な不溶性ポリマーおよびそれらの誘導体と、親水性合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））との共有結合によって形成されている。天然に存在するポリマーおよびそれらの誘導体には、ヒアルロン酸のような多糖類、コンドロイチン硫酸A（4-スルフェート）、コンドロイチン硫酸C（6-スルフェート）、およびデルマタン硫酸（コンドロイチン硫酸B）のようなプロテオグリカン類；キチン；ヘパリンおよびヘパリン硫酸；サイクロデキストラン、ヒドロキシルエチルセルロース、セルロ

ースエーテル、およびデンプンのようなデキストラン類；トリグリセリド、リン脂質などのような脂質（トリヒドロキシアルコールグリセロールと脂肪酸とのエステル）が含まれる。この親水性合成ポリマーは、好ましくは、約100～約100,000）好ましくは約1,500～20,000の範囲の重量平均分子量を有する、ポリエチレングリコールおよびそれらの誘導体である。組成物および成分は、この結合体、および、他の成分（例えば、注入可能な処方物を形成するための薬学的に受容可能な流動性キャリア、および／または、サイトカインおよび増殖因子のような生物学的に活性なタンパク質）を用いて処方され得る。本発明の生体適合性結合体は、一般に、それが形成されるときには多量の水を含み、比較的

固形の物（再吸水（rehydration）して5倍またはそれ以上の大きさに膨張する）を形成するために脱水され得る。特有の所望の特性を得るために、移植片は、結合体処方物によりコートされ得、チューブおよび糸状物（string）のような物品（article）は、特定の結合体および処方物を用いて構築され得る。

本発明の生体適合性の結合体は、種々の医療用途および薬学的用途において適用され、用いられる。最も基本的な実施態様には、生体適合性の結合体およびそれらの結合体を用いて処方された薬学的組成物（タイプおよび量の異なる薬学的に受容可能な流動性キャリアを含む組成物である）が含まれる。この結合体を形成する際、多様な天然ポリマーがポリエチレングリコールのような合成ポリマーと共有結合する。この特定のポリマーは、最終用途および所望の特性に基づいて選択される。結合するポリマーを選択することに加えて、異なるタイプの共有結合（エステル結合、エーテル結合、およびウレタン結合を含む）が用いられ得る。

本発明の特定の結合体および組成物の最も重要な用途の一つは、軟組織の増強方法にある。この組成物は、軟組織の増強の目的で、流動性形態に処方され、そして被験体（顔面など）に注入される。この方法は、天然に存在するポリマーと合成ポリマーとの間の反応がインサイチュで起きるように変更され得る。この結合体は、脱水され得、次いで粒子へと粉碎され得、不活性な非水性キャリア中に懸濁され得、そして

被験体に注入され得る。注入後、キャリアは、通常の生理学的条件で除去され、そして、粒子は、再吸水し、それらの元の大きさまで膨張する。結合体から形成された糸状物も、また、軟組織の増強を得るために注入され得る。

本発明の結合体および結合体組成物は、組織増殖を促進させるサイトカインまたは増殖因子と組み合わせられ得、そして／またはさらに粒子、ファイバー、または他の材料と、組成物の構造的完全性 (structural integrity) を増加するために組み合わせられ得るので、骨や軟骨などの硬組織の増強にもまた用いられ得る。結合体の他の用途には、体内に組み込む多様な医療用デバイス (カテーテル、移植骨、および動脈瘤を治療するための白金ワイヤ) へのコーティングが含まれる。結合体はまた、レンチクルスまたは角膜シールドのような多様な眼科用デバイスに処方され得る。結合体処方物は、縫合および血管または神経修復用などの医療用途を有する糸状物およびチューブのような形状に、押し出され、注形され、および／または、形成される。

本発明の第1の目的は、ポリエチレングリコールのようなポリマーと、天然に存在する、非免疫原性形態の、不溶性の、生物学的に不活性なポリマーまたはそれらの誘導体との共有結合により形成される生体適合性結合体を提供することである。

本発明の他の目的は、異なる結合タイプによる結合体を提供することであり、注入するのに適した薬学的に受容可能な

流動性キャリア中に結合体を含有する組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、結合体を形成する工程、該結合体を脱水して固形物を形成する工程、該固形物を粉碎して粒子にする工程、そして増強 (その時、該粒子は再吸水し、約5倍の大きさに膨張する) する部位に注入するために該粒子を非水性流動性キャリア中に懸濁させる工程により製造される、組織の増強のための組成物を提供することである。

本発明の他の目的は、表面が生体適合性結合体処方物でコートされた移植片のような物品を提供することである。

さらに他の目的は、結合体材料で作製された糸状物を提供することである。

さらに他の目的は、結合体材料で作製されたチューブを提供することである。

生体適合性結合体を含有する本発明の重要な利点は、エーテル結合などの特定のタイプの共有結合が、生理学的条件下での長期にわたる高度な安定性を提供するために用いられ得ることである。

本発明の特徴は、結合体が、多様な天然および合成ポリマー（それぞれ、得られる組成物の物理的および化学的特性を調節するために分子量の範囲を有する（occur））を用いて形成され得ることである。

本発明の他の利点は、この生体適合性結合体が、従来のコラーゲン組成物と比較して、優れた取り扱い特性を有するこ

とである。

本発明の他の利点は、この生体適合性結合体組成物が、従来のコラーゲン組成物と比較して、免疫反応を低下させることである。

本発明の他の特徴は、この生体適合性結合体組成物が、従来の組成物と比較して、改良された成形性、順応性、および弾性を有することである。

本発明の他の特徴には、生理学的条件下で、例えば、サイトカインまたは増殖因子の活性および利用可能な半減期を改良するために、この組成物および結合体を、薬学的に活性なタンパク質（例えば、サイトカインまたは増殖因子）と組み合わせて処方する能力が含まれる。

本発明の他の利点は、天然ポリマーと合成ポリマーとを連結するためにエーテル結合が用いられ得ることであり、この結合が加水分解に対して耐性であることである。

本発明のこれらのおよび他の目的、利点、および特徴は、本明細書の一部である特定の例および処方物を参照し、以下に十分に記載されている、この生体適合性結合体の構造、合成、および使用に関する詳細な説明を、読むことにより、当業者に明らかとなる。

図面の簡単な説明

図1は、種々の糸状物の膨張能試験の結果を示す棒グラフである；

図 2、3、4 および 5 は、それぞれ、種々の糸状物の物理的性質の試験結果を示す棒グラフである；

図 6 および 7 は、それぞれ、コラーゲン含有組成物の DSC 測定値の比較を示す；

図 8 は、ヒアルロン酸のカルボキシル基と PEG-ヒドラジンとの反応の反応スキームを示す；

図 9 は、ヒアルロン酸のアセチル基がスクシンイミジル-PEG と反応する反応スキームを示す；

図 10 は、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C およびデルマタン硫酸（コンドロイチン硫酸 B）の構造を示す；

図 11 は、エステルと PEG との求核置換反応を示す反応スキームである；

図 12 は、ポリエチレンと E-PEG の多官能性活性化形態とが反応する反応スキームを示す；

図 13 は、ポリエチレンと S-PEG の多官能性活性化形態とが反応する反応スキームを示す；

図 14 は、実施例 13 によって製造された糸状物の測定結果を示す表である；

図 15 は、コラーゲンおよびコラーゲン結合体を含む糸状物に関する物理的データを示す表である；

図 16 は、実施例 15 によって製造された材料の測定から得られるデータを示す表である；

図 17 は、実施例 18 によって製造された材料について得

られた測定結果を示す表である。

本発明の好適な実施態様の詳細な説明

本発明の生体適合性結合体およびその製造および使用工程を記載する前に、本発明が記載された特定の結合体、工程、および方法に限定されず、これらは当然変更し得ることが理解されるべきである。本明細書で用いられる用語は、個々の実施態様のみを記載することを目的としており、限定することを意図せず、本発明の範囲は添付された請求の範囲によってのみ限定されることもまた理解される

べきである。

本明細書中および添付の請求の範囲で用いられる単数の形態は、文中で特にこ
とわりのない限り、複数の指示物を包含することに注意すべきである。従って、
例えば、「天然に存在するポリマー」との表記は、そのような複数のポリマーの
混合物を包含し、「結合基」または「架橋基」との表記は、当業者に公知かまた
は共有結合を形成し得る、1種またはそれ以上の異なるタイプの基を包含し、そ
して、「合成ポリマー」との表記は、異なるタイプの複数のポリマー（例えば、
ポリエチレングリコール（PEG）など）の混合物を包含する。

他に定義しなければ、本明細書中で用いられる全ての技術用語および科学用語
は、本発明の属する分野の当業者に一般に理解されるのと同様の意味を有する。
本明細書に記載されるのと類似するか、または同等の任意の方法および材料が、
本発明の実施または試験において有用であり得るが、好まし

い方法および材料のみについて以下に記載される。本明細書中に記載される全て
の文献は、本明細書中に参考として援用される。さらに、本発明の説明に特に重
要な特定の用語を以下に定義する。

A. 定義

本明細書中で用いられる用語「コラーゲン」は、テロペプチド含有コラーゲン
およびアテロペプチドコラーゲン（加工または修飾されている）を包含する、任
意の形態のコラーゲンを意味する。コラーゲンは、ヒトまたは動物起源であり得
、そして組み換え技術により産生され得る。形態には多様な型（すなわち I、II
、III型、繊維性、非繊維性など）が包含される。コラーゲンは、動物の骨、軟
骨、皮膚、および結合組織の主要タンパク質成分である材料である。天然型のコ
ラーゲンは、典型的には剛直な棒状の分子で、長さおよそ300nmおよび直径1.5nm
である。このコラーゲンは、3本のコラーゲンポリペプチドからなり、密着した
3重らせんを形成している。コラーゲンポリペプチドは繰り返し配列-Gly-X-Y-
を有する長い中央部分により特徴付けられ（ここで、XおよびYはしばしばプロ
リンまたはヒドロキシプロリンである）、各末端は「テロペプチド」領域（分子
の約5%未満を構成する）と結合している。コラーゲン鎖のテロペプチド領域は

、典型的には、天然に存在する鎖間での架橋、およびタンパク質の免疫原性に寄与する。コラーゲンには数種類の「型」があり、そ

れぞれ異なる物理的特性を有する。最も豊富な型は、I型～III型である。本発明の開示は、これらのコラーゲン、および他の公知の型のコラーゲン（天然コラーゲン、および加工または修飾したコラーゲン（つまり、種々のコラーゲン誘導体））を包含する。コラーゲンは、典型的には、天然ソース（例えば、ウシの皮、軟骨、または骨）から単離される。骨からは通常、乾燥、脱脂、粉碎、そして無機質脱落を行ってコラーゲンが抽出される。一方、皮および軟骨は、通常、細かく刻まれ、そしてコラゲナーゼ以外のタンパク質分解酵素で消化される。コラーゲンは、大部分のタンパク質分解酵素に耐性であるので、好都合には、この手法によりコラーゲンと共に存在する不純タンパク質の大部分が除去される。

用語「脱水された」は、材料を空気乾燥するか、または凍結乾燥して実質的に全ての結合していない水を除去することを意味する。

本明細書で用いられる用語「天然に存在するポリマー」および「天然ポリマー」は、生物学的に不活性な、不溶性の、天然に存在する、生体適合性ポリマーおよびそれらの誘導体を意味する。天然ポリマーの例としては、ヒアルロン酸のような多糖類、コンドロイチン硫酸A（4-スルフェート）、コンドロイチン硫酸C（6-スルフェート）、およびデルマトン硫酸（コンドロイチン硫酸B）のようなプロテオグリカン類；サイクロデキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、セルロースエーテル、およびデンプンのようなデキスト

ラン類；トリグリセリド、リン脂質などのような脂質（トリヒドロキシアルコールグリセロールと脂肪酸とのエステル）、およびこれらの混合物ならびに誘導体が含まれる。この用語には、DNA、RNA、およびタンパク質などの生物学的に活性な天然ポリマーが特に含まれないことを意図している。

用語「生物学的に不活性な結合体」、「生体適合性結合体」、および「生物学的に不活性な生体適合性結合体」は、本明細書中では交換可能に用いられる。これらの用語は、生物学的に不活性で不溶性の、本発明の生体適合性結合体（ここ

で天然ポリマーは、親水性合成ポリマーと共有結合している。)を意味する。この結合体は、生物学的に不活性で不溶性の非毒性のポリマーであって、生体に組み込まれても、顕著な免疫反応を生じさせない天然ポリマーと同様のいくつかの特性を有する。

本明細書で用いられる用語「親水性合成ポリマー」は、本質的に親水性であるが完全に水溶性でないポリマーになるような平均分子量および組成を有する合成ポリマーを意味する。好ましいポリマーは、薬学的に純粋であるように高度に精製されている。最も親水性のポリマーは、水溶液中で水素結合を形成させるために、十分な数の酸素原子を組み込むことにより（または、あまり用いないが、窒素原子を組み込むことにより）水溶性にされ得る。好ましいポリマーは、親水性であるが、必ずしも水溶性ではない。本明細書中で用いられる親水性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール (PEG)、ポ

リオキシエチレン、ポリメチレングリコール、ポリトリメチレングリコール、ポリビニルピロリドン、およびそれらの誘導体が挙げられ、PEGが特に好ましい。ポリマーは、直鎖状であり得るかまたは多分岐状であり得、実質的に架橋していない。他の適切なポリマーとしては、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンブロックポリマーおよびコポリマーが挙げられる。エチレンジアミン核を有する（従って、4つの末端を有する）ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンブロックポリマーも、入手可能であり、そして本発明の実施に用いられ得る。天然に存在するポリマー（例えば、タンパク質、デンプン、セルロース、ヘパリンなど）は、この定義の範囲から明らかに除外される。全ての適切な合成ポリマーは、皮下投与されたときに、非毒性、非炎症性、そして非免疫原性であり、そして好ましくは、少なくとも数カ月の期間にわたって、インビボで本質的に非分解性である。親水性ポリマーは、天然ポリマーの親水性を増大し得るが、水溶性にはしない。現在、好ましい親水性合成ポリマーとしては、一官能性、二官能性、および多官能性の活性化ポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。一官能性PEGは、一つの反応性のヒドロキシ基のみを有するのに対して、二官能性PEGは、分子の各末端に反応性の基を有する。一官能性PEGは、好ましくは約100と約15

、000との間、さらに好ましくは約200と約8,000との間、そして最も好ましくは約4,000の重量平均分子量を有する。二官能性PEGは、好ましくは約400～約100,000、さらに好

ましくは約3,000と約20,000との間の重量平均分子量を有する。多官能性PEGは、好ましくは、約3,000と100,000との間の平均分子量を有する。

本明細書中で用いられる用語「多官能性」は、1分子あたり、2またはそれより多い反応基を有する合成ポリマーを意味し、この用語自体が、用語「二官能性」を包含する。

用語「一官能性」、「二官能性」、および「多官能性」は、本明細書中では、用語「一官能性活性化」「二官能性活性化」および「多官能性活性化」とそれぞれ交換可能に用いられる。

PEGは、一つの末端でアルキレンエーテル基を形成することにより、一官能性となり得る。アルキレンエーテル基は、1～6個の炭素原子を有する任意の適切なアルコキシ基であり得、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、2-プロポキシ、ブトキシ、ヘキシルオキシなどであり得る。現在のところ、メトキシが好ましい。二官能性活性化PEGは、直鎖状分子の各末端に反応性のヒドロキシ基を与えることにより提供される。反応性の基は、好ましくは、ポリマーの末端に位置するが、その鎖状方向わたって提供されてもよい。多官能性活性化合成分子は、本発明の組成物を架橋し得、そしてさらに、サイトカインまたは増殖因子と天然ポリマーとを結合するために用いられ得る。合成ポリマーに関して、略語が以下のように用いられる：

モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) ；二官能性PEGスクシンイミジルグルタレート (SG-PEG) ；二官能性PEGス

クシンイミジル (S-PEG) ；二官能性PEGスクシンイミジルカーボネート (SC-PEG) ；二官能性PEGプロピオンアルデヒド (A-PEG) ；および二官能性PEGグリシジルエーテル (E-PEG)。省略語「d PEG」には、種々のタイプの二官能性ポリエチレングリコールが包含される。

本明細書中で用いられる用語「化学的に結合した」は、化学的共有結合を介して結合していることを意味する。本発明の実施において、親水性合成ポリマーと天然ポリマーまたはその誘導体とは、好ましくは共有結合（単数および複数）を介して互いに直接結合している。しかし、結合基を用いることにより化学的に結合され得る（親水性合成ポリマーおよび天然ポリマーは、それぞれ結合基に結合するが、互いに直接は結合しない）。用語「生体適合性の結合体」は、本発明における意味の中では、親水性合成ポリマーと化学的に結合した天然ポリマーを意味する。従って、「天然ポリマー/PEG」（または「PEG/天然ポリマー」）とは、天然ポリマーがPEGと化学的に結合している本発明の組成物を示す。「天然ポリマー/PEG」は、二官能性活性化PEGと化学的に結合した、本発明の天然ポリマーを意味し、ここで、ポリマー分子は架橋し得る。合成ポリマーは、多くの異なるタイプの化学的結合を介して、天然ポリマーと「化学的に結合」され得る。例えば、この結合は、エステル結合またはウレタン結合を介していてもよいが、さらに好ましくはエーテル結合を介している。毒性化学材料を使用せずに形成され得ること、およびインビボ

で加水分解を容易には受けないという点で、エーテル結合が好ましい。

合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）は、実際には正確な分子量を有するように調製され得ないこと、および、本明細書中で用いられる用語「分子量」は、当該分野において一般に用いられるように、任意の所定のサンプル中の多数の分子の重量平均分子量を意味することが当業者に理解される。従って、PEG 2,000のサンプルは、例えば、1,500～2,500ダルトンの重量範囲のポリマー分子の統計学的混合物を含み得、1つの分子は、ある範囲にわたって他の分子とわずかに異なる。分子量範囲の記載により、平均分子量が、指定した範囲の間のいかなる値でもよく、そしてこれらの制限を越える分子を包含し得ることが示される。従って、約300～約20,000の分子量範囲は、少なくとも約800～約20kDaまでの範囲の平均分子量を示す。

本明細書中で用いられる用語「使用可能なリシン残基」は、活性化PEGと反応する様式で位置する、天然ポリマー分子の外側表面上にさらされたリシン側鎖を

意味する。使用可能なリシン残基の数は、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (TNBS) との反応により決定され得る。

本明細書中で用いられる用語「処置」および「治療」は、欠損、特に、軟組織または軟組織支持体の損失または欠落、あるいは骨または軟骨の損失または欠落による欠損の増強、修復、予防、または緩和を意味する。さらに用語「処置」は

本発明の糸状物を創傷の縫合に用いること、および本発明のチューブを、生物、特にヒトの体のチャンネル (channel) の修復、置換、または増強に用いることを包含する。さらに、「処置」および「治療」はまた、本発明の結合体含有組成物と結合および／または混合した生物学的に活性なタンパク質を用いた、障害または疾患の予防、維持、または緩和を意味する。従って、軟組織の治療としては、軟組織の増強 (例えば、皮膚のしわまたは溝の除去において、または、老化のために脂肪が失われる上顎部分の皮下脂肪の置換において、通常または所望の皮膚外形を再形成するための本発明の結合体の移植)、または粘膜下組織 (例えば、泌尿系括約筋または食道下部括約筋) の増強における軟組織の増強が挙げられる。骨および軟骨の治療としては、骨組織を置換または修復するための (例えば、骨偽関節または骨折の治療における)、結合体の使用、特に、適切な粒子状材料と組み合わせた天然ポリマー/PEGの使用が挙げられる。骨の治療にはまた、付加的な骨増殖因子を存在させて、または存在させずに、結合体含有組成物を使用することが包含される。結合体と共にセラミック粒子 (好ましくは、ヒドロキシアパタイトおよび／またはリン酸三カルシウムのようなリン酸カルシウム) を含有する組成物は、その優れた引張強度のために、応力に耐える骨を修復するのに特に有用である。

用語「サイトカイン」および「増殖因子」は、正常組織の回復または再増殖を促進する生物学的に活性な分子および活

性なペプチド (天然に存在し得るか、または合成され得る) を記載するのに用いられる。サイトカインおよび増殖因子の機能は、以下の二点である: (1) これ

らは、新しいコラーゲンまたは組織をつくるために局所細胞を刺激し得るか、または(2)これらは、修正を必要とする部位へ細胞を誘引し得る。このように、サイトカインおよび増殖因子は、移植片の「生物学的つなぎとめ(biological anchoring)」を宿主組織内で促進させるために作用する。前記のように、サイトカインまたは増殖因子は、結合体と混合され得るか、または結合体と化学的に結合され得るかのいずれかである。例えば、ある結合体は、サイトカイン(例えば、インターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン、コロニー刺激因子(CSF)など)、または増殖因子(例えば、骨形成因子抽出物(osteogenic factor extract)(OFE)、上皮増殖因子(EGF)、形質転換増殖因子(TGF) α 、TGF- β (TGF- β のいかなる組み合わせも包含する)、TGF- β 1、TGF- β 2、血小板由来増殖因子(PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB)、酸性線維芽細胞増殖因子(FGF)、塩基性FGF、結合組織活性化ペプチド(CTAP)、 β -トロンプグロブリン、インシュリン様増殖因子、エリスロポエチン(EPO)、神経成長因子(NGF)、骨形態形成タンパク質(bonemorphogenic protein)(BMP)、骨形成因子など)を組み込み得る。このようなサイトカイン、または増殖因子、およびサイトカインと増殖因子との適切な組み合わせを取り込むことにより、移植片の正常組織への再増殖および再成形が促進され

得るか、または傷の治療に用いられ得る。さらに、合成段階で、多官能性ポリマー分子を適量用いることにより、サイトカインまたは増殖因子は、生体適合性結合体と化学的に結合し得る。次いで、PEGを任意の天然ポリマーと結合させるのに用いたのと同様の方法によって、または任意の他の適切な方法によって、サイトカインまたは増殖因子が、ポリマーの遊離末端に結合され得る。サイトカインまたは増殖因子分子を移植片につなぎとめることにより、効果的な治療に必要とされるサイトカインまたは増殖因子の量が、実質的に減少する。サイトカインまたは増殖因子が組み込まれた結合体は、効果的なコントロールされた放出薬物送達手段として機能し得る。サイトカインと結合体との間の化学結合を変化させることによって、サイトカインまたは増殖因子の放出に関する効果を変化させることが可能である。例えば、「エステル」結合が用いられると、結合は生理学的条

件下でより容易に切断され、マトリックスからの増殖因子またはサイトカインの放出が維持される。しかしながら、「エーテル」結合が用いられると、結合は容易には切断されず、そして、サイトカインまたは増殖因子は、その活性部位をさらしながら、より長期間その場所に残留し、タンパク質の活性部位に対する本来の基質に対して生物学的効果を提供する。サイトカインまたは増殖因子の放出に関する効果の多様性を得るために、異なる結合を有する結合体の混合物を含むことが可能である。つまり、所望の放出速度を得るために、放出持続効果が変更され得る。

用語「有効な量」は、所望する効果を得るために必要とされる組成物の量を意味する。従って、サイトカインまたは増殖因子を含有する組成物の「組織の増殖を促進する量」とは、検出可能な程度に組織の増殖を刺激するのに必要とされるサイトカインまたは増殖因子の量を意味する。ここでいう組織とは、結合組織、骨、軟骨、上皮および真皮、血液、および他の組織を包含する。有効な量であると考えられる実際の量は、さまざまな因子（例えば、患者の大きさ、病状（condition）、性別、および年齢）に依存して変化し、医師（caregiver）により容易に決定され得る。

本明細書中で用いられる用語「十分な量」は、本発明の結合体と組み合わせて用いられるキャリアの量を示すのに用いられる。十分な量とは、それを結合体と混合したときに、所望の物理的形態（例えば、注入可能な溶液、注入可能な懸濁液、可塑性または順応性の移植片、応力に耐える固い移植片、糸状物、チューブなど）が得られる量である。注入可能な処方物は、一般に、組成物をなめらかで注入可能にするのに十分な量の流動性キャリアを含むのに対して、順応性の移植片は、キャリアの量が実質的に少量であり、そして粘度様の硬度（consistency）を有する。応力に耐える固い移植片は、キャリアを全く含み得ず、そして高度の構造的完全性を有し得る。キャリアの量は、用いる特定の結合体、および所望する最終結果に依存して変化し得、そして調節され得る。このような調節は、本発明の開示を読むことにより当業者に明らかとな

る。

本明細書中で用いられる用語「適切な粒子状材料」は、実質的に水に不溶であり、非免疫原性であり、生体適合性であり、そして本発明の生体適合性結合体と混和しない粒子状材料を意味する。材料粒子は、繊維状であり得、あるいは直径約20~250 μ mの大きさの範囲であり得、そして、形状がビーズ様または不規則であり得る。典型的な粒子状材料としては、繊維性架橋コラーゲン、ゼラチンビーズ、架橋コラーゲン-dPEG粒子、ポリテトラフルオロエチレンビーズ、シリコーンゴムビーズ、ヒドロゲルビーズ、炭化ケイ素ビーズ、およびガラスビーズが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい粒子状材料とは、リン酸カルシウム、最も好ましくは、ヒドロキシアパタイト粒子および／またはリン酸三カルシウムである。

用語「固い (solid) 移植片」は、体内での挿入および使用のために設計される任意のブロックを意味し、そしてこれには、骨および軟骨移植片（例えば、金属、プラスチック、および／または他の材料から構成される人工関節、保持ピン (retaining pin)、頭部プレートなど）、縫合のために使用され得、あるいは軟組織の増強のために注入され得る糸状物、胸部移植片（例えば、シリコーンゲルエンベロープ、発泡体など）、長期間（約3日を越える）の使用を意図したカテーテルおよびカニューレ、本発明のチューブから形成される人工器官およびチューブ（例えば、人工心臓、脾臓、腎臓、血管など）、

薬物送達用デバイス（モノリスの移植片、ポンプ、およびコ

ントロールされた放出デバイス（例えば、Alzet[®]ミニポンプ）、

同化成長または避妊のためのステロイドペレットなどを包含する）、皮膚または内部使用のための縫合糸、歯根膜、レンチクル、角膜シールド、動脈瘤治療のための白金ワイヤなどが包含される。用語「固い移植片」は、それ自体、本発明の生体適合性結合体組成物から形成された移植片と、本発明の組成物でコートされ得る、他の合成材料（例えば、シリコーン、ポリウレタン、チタニウム、白金など）との両方を包含する。

本明細書中で用いられる用語「適切な繊維材料」は、実質的に水に不溶であり、非免疫原性であり、生体適合性であり、そして本発明の生体適合性の結合体と混和しない繊維材料を意味する。繊維材料は、これらの特性を有する種々の材料を包含し得、そして、医療用および薬学的用途に関連して用いられる種々の移植片またはデバイス（例えば、結合体を含有するチューブ）の構造的完全性を形成および／または提供するために、結合体組成物と組み合わせられる。本発明の結合体組成物は、「適切な繊維材料」上にコートし得、次に、これで骨の周りを包み得、骨の構造的完全性が提供される。従って、「適切な繊維材料」は、本発明の「固い移植片」を形成することにおいて有用である。

本明細書中で用いられる用語「インサイチュ」は、「投与の部位で」を意味する。従って、注入可能な反応混合組成物

は、増強が必要な部位へ注入されるか、あるいは付与され、そして注入部位で架橋する。適切な部位は、一般に、皮膚の支持を増強するためには皮内または皮下領域であり、傷の治癒および骨の修復のためには骨折部位であり、そして、括約筋増強のためには（例えば、自製の回復のためには）括約筋組織内である。

用語「水性混合物」としては、天然ポリマーおよび水を含む流体溶液、懸濁液、分散体、コロイドなどが挙げられる。

本明細書で用いられる用語「NFC軟骨」は、生理学的硬度の点で軟骨と類似している本発明の組成物を意味する。NFC軟骨は、非繊維性コラーゲン（例えば、コラーゲン溶液）から調製され、親水性ポリマー（特にdPEGが用いられる）と架橋している。製造工程の加工品（artifact）として、またはデザインにより、NFC軟骨は、約0～20%の繊維性コラーゲンを含み得る。NFC軟骨は、通常、コラーゲンの酸性溶液に、酸性溶液中のdPEGを加えること、および、中和の前に結合を生じさせることにより調製される。用語「NFC-FC軟骨」は、NFC軟骨と類似の組成物（繊維性コラーゼンのパーセンテージが約20～80%である）を意味する。NFC-FC軟骨は、通常、コラーゲンの酸性溶液に、中性緩衝液中のdPEGを加えることにより調製される。中性緩衝液は、結合工程の間にコラーゲン繊維の形成を起こさせる。同様に、「FC軟骨」は、繊維性コラーゲンおよび二官能性親水性

ポリマーから調製される本発明

の組成物を意味する。FC軟骨は、通常、中性溶液／懸濁液中のdPEGおよび繊維性コラーゲンを用いることにより調製され得る。

B. 一般的方法

B. 1 調製：

本発明の生体適合性結合体を形成するために、天然ポリマーまたはそれらの誘導体は、親水性合成ポリマーと化学的に結合するべきである。これは、多くの方法を用いて達成され得る。好適な方法に従えば、親水性合成ポリマーが活性化され、次いで、天然ポリマーと直接反応する。他の方法においては、天然ポリマーに存在するヒドロキシル基またはアミノ基が活性化され得、活性化基がポリマーと反応して結合体を形成する。あまり好適でない方法に従えば、天然および合成ポリマーが同時に反応し、生体適合性結合体が形成されるような方法で、活性化されたヒドロキシル基またはアミノ基を有する結合基が、合成ポリマーおよび天然ポリマーと組み合わせられ得る。他の生体適合性結合体を形成する方法は、本明細書の開示を読めば当業者において明白となる。本発明の結合体は人体内で用いられるので、全ての成分（ポリマーおよび結合基の両方を含む）が患者と反応しまたは患者により拒絶されるおそれのない結合体を形成することが重要である。従って、毒性の、および／または、免疫反応性の成分は、出発材料として好ましくない。いくつかの好ましい出発材料お

よび結合体の形成方法を、以下にさらに記載する。

種々の親水性合成ポリマーが、結合体を形成するために用いられ得るが、このポリマーは、生体適合性で、比較的不溶性で、さらに親水性でなければならず、そして好ましくは、生体適合性が知られていることから1種またはそれより多いポリエチレングリコール（PEG）の形態である。種々の形態のPEGが、生物学的に活性な分子の修飾に広く用いられる。なぜなら、PEGは、広範囲の溶解性を有するように処方され得、そして、それは、毒性、抗原性、免疫原性がなく、そして典型的には酵素活性および／またはペプチドの立体配座を妨げないからである。

さらに、PEGは、一般に非生分解性であり、そしてヒトを含む殆どの生体から容易に抽出される。

本発明の結合体を形成する際の第一の工程には、PEG分子の官能化が一般に包含される。種々の官能化ポリエチレングリコールが、さまざまな分野（例えば、タンパク質修飾（Abuchowskiら、Enzymes as Drugs, John Wiley & Sons: New York,

NY (1981) pp. 367~383; および Dreborg ら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6:315 (これら両者は本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと)、ペプチドの化学 (Mutter ら、The Peptides, Academic: New York, NY 2:285~332; および Zalipsky ら、Int. J. Peptide Protein Res. (1987) 30:740 (これら両者は本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと)、およびポリマー薬物の合成 (Zalipsky ら、Eur. Polym. J. (1983) 19:1177; および

Ouchi ら、J. Macromol. Sci. -Chem. (1987) A24:1011 (これら両者は本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと) において効果的に用いられてきた。ポリエチレングリコールと薬学的に活性な特定のタンパク質との結合により形成される種々のタイプの結合体は、生体内におけるタンパク質の消化、免疫原性の低下、および半減期の増加に関連するこのような結合体の安定性を有するために、部分的な医療用途に有用であることがすでに開示され、そして認められている。

特に有用であると認められるポリエチレングリコールの一形態は、モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) であり、これは、塩化シアヌールのような化合物の添加により活性化され得、次いでタンパク質と結合し得る (Abuchowski ら、J. Biol. Chem. (1977) 252:3578 (これら両者は本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと)。活性ポリエチレングリコールのこのような製造方法は、本発明のある実施態様に関して用いられ得るが、これらの方法は、塩化シアヌールが比較的毒性であり、そして薬学的に受容可能な組成物を提供するためには、得られたいずれの生成物からもこの塩化シアヌールを完全に除去しな

ければならないので、特に望ましくはない。

PEGの活性化形態（mPEGの活性化形態を包含する）は、市販で購入され得る反応成分から作成され得る。本発明に関して特に有用であると認められる活性化PEGの一形態は、mPEG-ス

クシネート-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（SS-PEG）である（Abuchowskiら、Cancer Biochem. Biophys. (1984) 7:175（これは本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと）。SS-PEGのようなPEGの活性化形態は、比較的穏やかな条件下でタンパク質と反応し、そして、PEGと結合したタンパク質の特定の生物学的活性および特異性を損なうことなく結合体を製造する。しかしながら、このような活性化PEGは、タンパク質と反応する際、それらが反応し、そしてエステル結合を介した結合を形成する。エステル結合は本発明に関して用いられ得るが、それらは、長期間にわたって生理学的条件下に供されると加水分解を受けるので、特に好ましくはない（Dreborgら、Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6:315；およびUlbrichら、J. Makromol. Chem. (1986) 187:1131（これら両者は本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと）。

ウレタン結合を介してPEGとタンパク質とを結合させることは可能であり、それによって、エステル結合よりも加水分解に対してさらに耐性のさらに安定な結合が提供される（Zalipskyら、Polymeric Drug and Drug Delivery Systems、第10章、「ポリエチレングリコールのスクシンイミジルカーボネート」（1991）（これは、特定の生物学的活性タンパク質に対するPEGの種々の形態を結合することに包含される化学を開示するために本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと）。ウレタン結合の安定性は、生理学的条件下におい

て示された（Veroneseら、Appl. Biochem. Biotechnol. (1985) 11:141；およびLarwoodら、J. Labelled Compounds Radiopharm (1984) 21:603（これら両者は本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと）。PEGとタンパク質とを結合させる他の手段は、カルバメート結合によるものであり得る（Beaucham

pら、Anal. Biochem. (1983) 131:25 ; およびBergerら、Blood (1988) 71:164
1 (これら両者は本明細書中で参考として援用されている) を参照のこと)。カルバメート結合は、カルボニルジイミダゾール-活性化PEGを用いることにより生成される。この結合はいくつかの利点を有するが、反応は比較的遅く、そして完結するのに2～3日かかり得る。

上記のPEGを活性化する種々の手段、および、活性手段に関して引用した文献(これらは全て本明細書中で参考として援用されている)では、PEGと特定の生物学的に活性なタンパク質とを結合することに関して記載されているが、不活性な(生物学的に活性でない)天然ポリマーと結合することは記載されていない(Polymeric Drug and Drug Delivery Systems、第10章、「ポリエチレングリコールのスクシンイミジルカーボネート」(1991)(これは、特定の生物学的活性タンパク質に対するPEGの種々の形態を結合することに包含される化学を開示するために本明細書中で参考として援用されている)を参照のこと)。コラーゲンはまた、1992年11月10日に発行された米国特許第5,162,430号に教示されているように、エステル結合を介したPEGと結合する(これもまた本明細書中で参

考として援用されている)。本発明は、活性化PEG化合物が、不活性で種々の異なるタイプの結合と共に保持する生体適合性の結合体の形成に関して用いられ得ることを開示するものである。このような結合体は、一連の改良された予想し得ない性質を提供し、そして、本発明の種々の組成物および物品を形成するために用いられ得る。

B. 2 活性化PEGの特定の形態

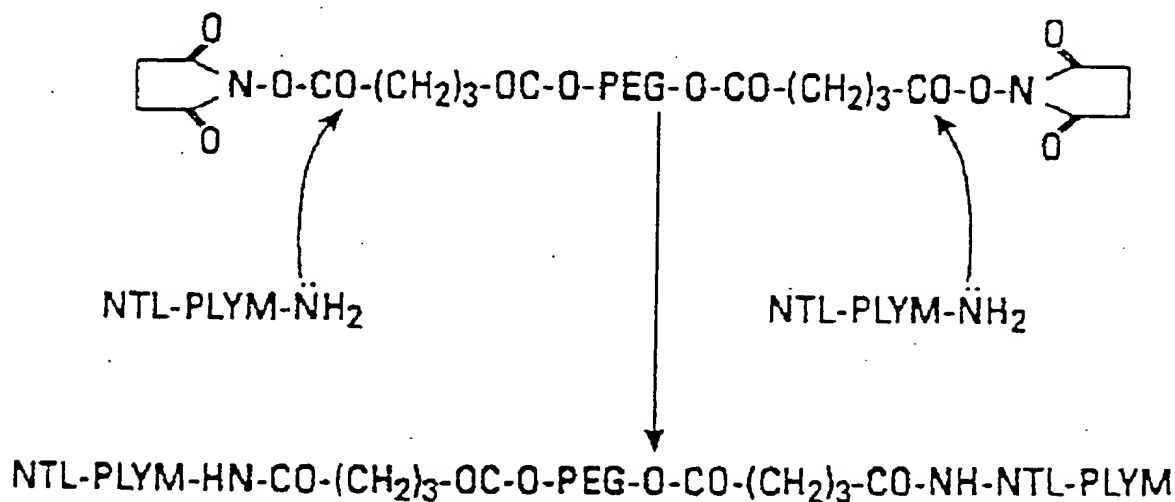
上述したように、本発明の結合体は、多様な異なるタイプの親水性合成ポリマーと天然ポリマーまたはそれらの誘導体との共有結合により調製され得る。しかしながら、得られた最終生成物または結合体は、生体適合性および非免疫原性などの多くの性質を有していなければならないという点で、親水性合成ポリマーとしてポリエチレングリコールを用いることが有効であることが見い出されている。ポリエチレングリコールは、分子の1つまたは好ましくは2つの末端に活性化基を提供するためには修飾されていなければならない、その結果、PEGと天然ポリ

マーとの間で共有結合が生じる。いくつかの官能化されたPEGの特定の形態を以下に構造的に示し、これらのPEGの官能化された形態と天然ポリマーまたはそれらの誘導体との反応により得られた反応生成物も同様に示す。

1. 天然ポリマーのPEG結合：

最初の官能化PEGは、二官能性PEGスクシンイミジルグルタレートであり、本明細書中では (SG-PEG) と表記する。この分子の構造式、およびそれとアミノ基NH₂を有する天然ポリマー (NTL-PLYMと示す) とを反応させて得られる反応生成物を以下の式1に示す。

SG-PEG：二官能性PEGスクシンイミジルグルタレート



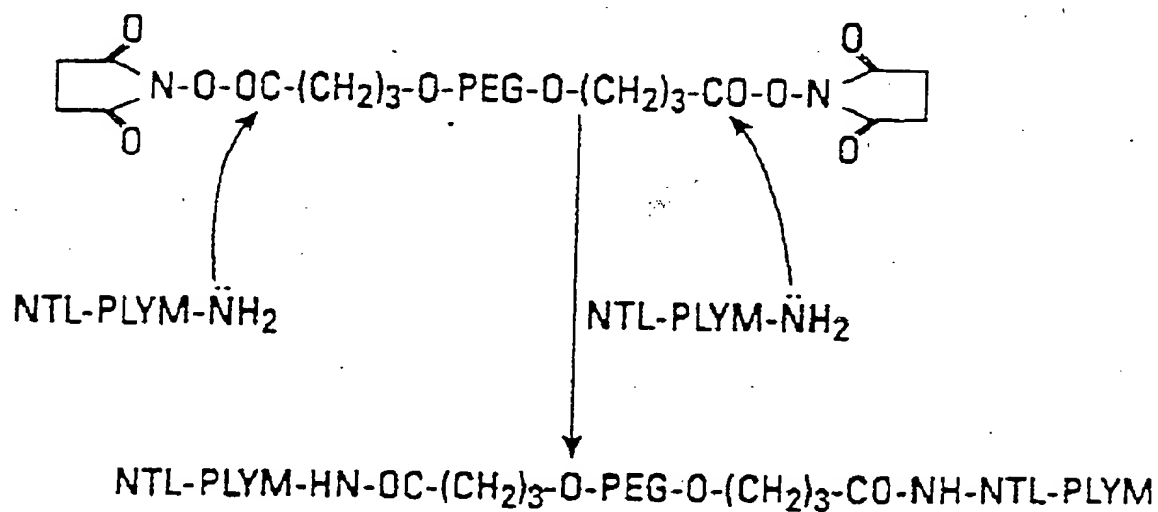
式 1

他のPEGの二官能性活性化形態は、PEGスクシンイミジル (S-PEG) と称される。この化合物の構造式、およびそれと天然ポリマーとを反応させて得られる反応生成物を以下に示す。メ

チル基が分子の各末端に3回繰り返されることに注目すべきである。この化合物の一般構造式においては、下付き文字3は、「n」で置換される。式1および2に示される特定の実施態様においては、PEGの両側に繰り返しのCH₂基が3つあるので、nは3である。式2における構造体は、二官能性PEGと各末端の天然ポ

リマーとの間の「エーテル」結合を含む。このエーテル結合は加水分解されない。これは、エステル結合が提供された式1に示される結合体とは異なる。このエステル結合は、生理学的条件下で加水分解を受ける。

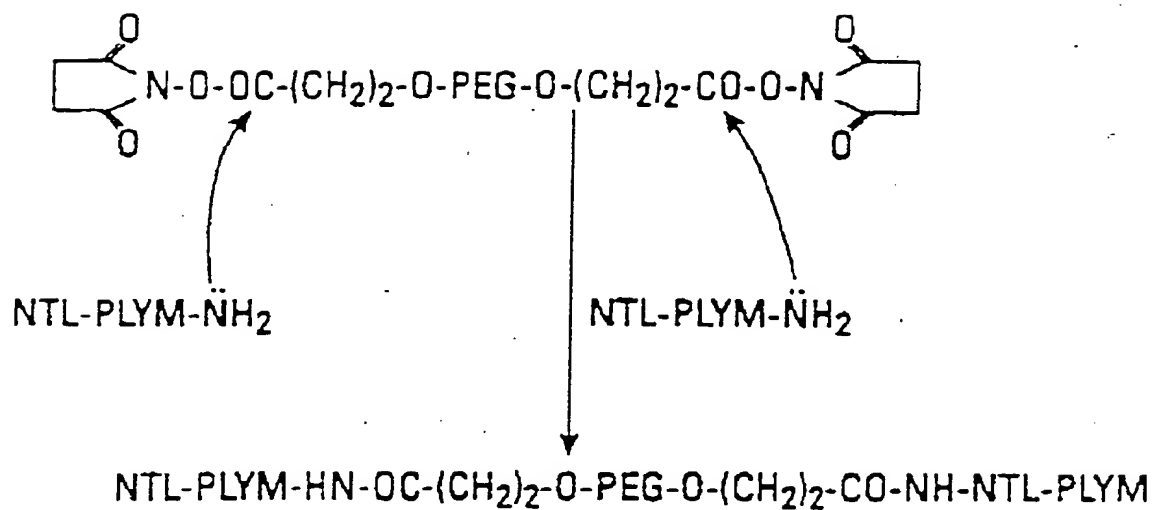
S-PEG, $n = 3$: 二官能性 PEG スクシンイミジル



式 2

さらに、誘導体化PEGとコラーゲンとを反応させることにより形成される結合体である、他のポリエチレングリコールの誘導体化形態 ($n = 2$) を式3に示す。

S-PEG, $n = 2$: 二官能性 PEG スクシンイミジル

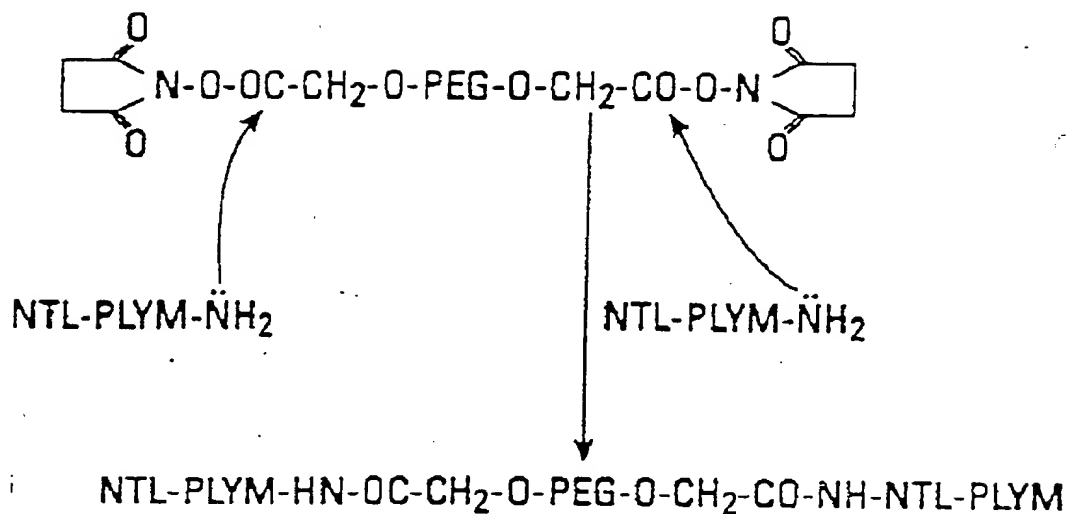


式 3

式 2 および 3 において提供される結合体と同様の本発明の他の好ましい実施態様は、 $n = 1$ のときに提供される。構造式および得られる結合体を式 4 に示す。この結合体が、エーテル結合およびペプチド結合の両方を含むことが注目される。

これらの結合は、生理学的条件下で安定である。

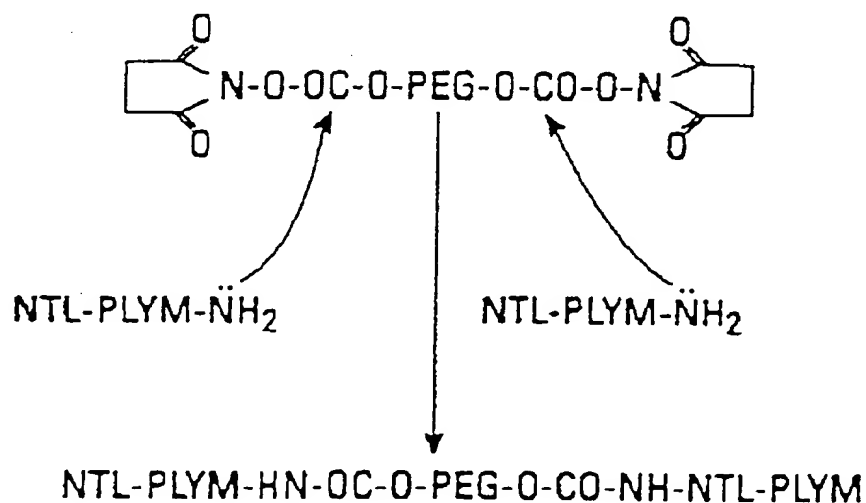
S-PEG, $n = 1$: 二官能性 PEG スクシンイミジル



式 4

PEGのさらに他の誘導体形態は、 $n = 0$ のときに提供される。この二官能性形態は、PEGスクシンイミジルカーボネート (SC-PEG) と称される。この化合物の構造式、およびSC-PEGとコラーゲンとを反応させることにより形成される結合体を式5に示す。この結合はウレタン結合を含んでいるが、この結合体は生理学的条件下で高度な安定性を有することは認められない。

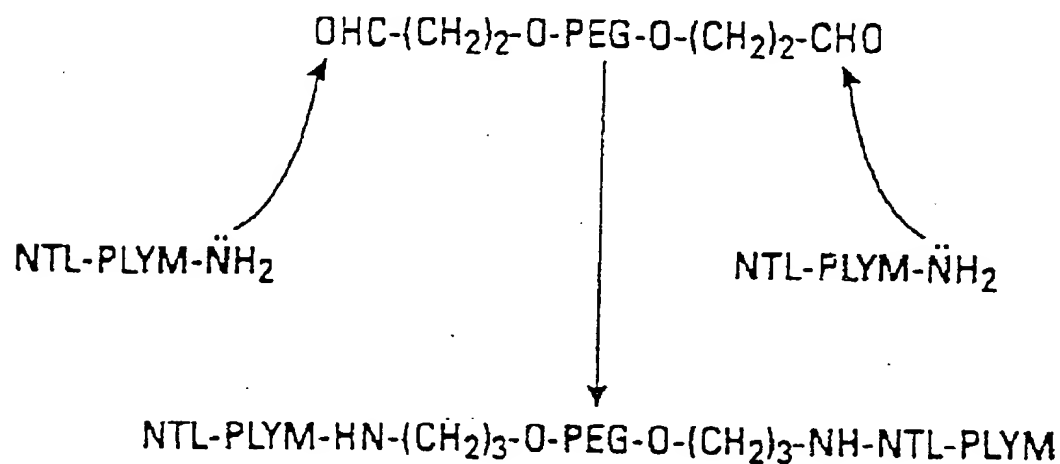
SC-PEG, $n = 0$: 二官能性PEGスクシンイミジルカーボネート



式 5

上記の全ての誘導体は、スクシンイミジル基を中に含む。しかしながら、異なる活性基が、PEG分子の一端または両端に結合し得る。例えば、PEGは、A-PEGと天然のポリマーまたはその誘導体との反応により形成される結合体であるような式6に示す二官能性PEGプロピオンアルデヒド（A-PEG）を形成するために誘導体化され得る。

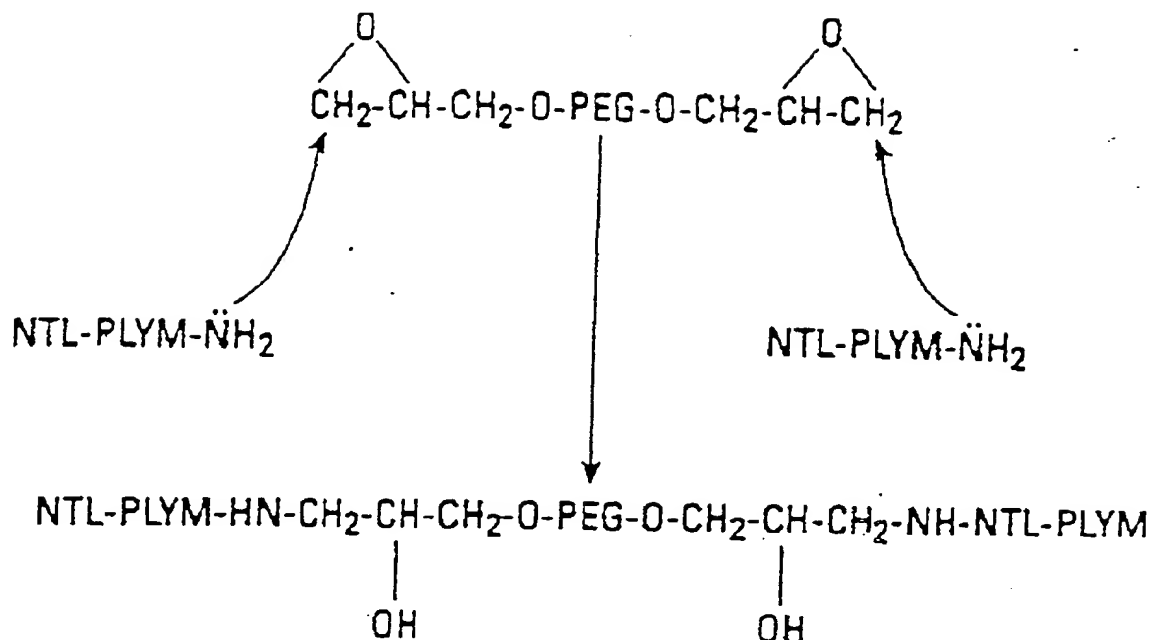
A-PEG：二官能性PEGプロピオンアルデヒド



式 6

さらに、ポリエチレングリコールの他の二官能性形態は、天然のポリマーまたはその誘導体とを反応させることにより形成される結合体であるような、式7に示すPEGグリシジルエーテル（E-PEG）である。

E-PEG：二官能性PEGグリシジルエーテル



式 7

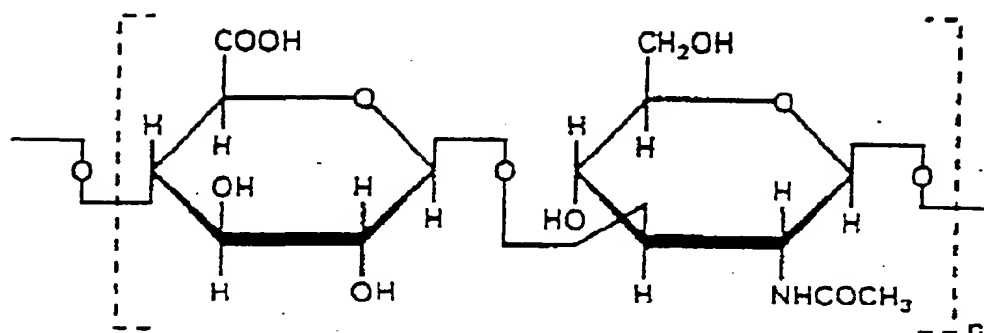
官能化された形態のPEGを用いて形成された結合体は、反応に用いられるPEGの官能化された形態に依存して変化する。さらに、最終生成物も、PEGの分子量を変化させることにより、その性質に関連して変化する。一般に、結合体の安定性は、PEGと天然ポリマーとの間のすべてのエステル結合を排除すること、および、エーテル結合および／またはウレタン結合を含有することにより改良される。ある状況では、所望により弱いエステル結合を含有し、この結合が生理学的条件下での加水分解、マトリックスの破壊、そして内部に保持されている成分（例えば、増殖因子またはサイトカイン）の放出によ

り、徐々に破壊される。結合の化学的構造の変化により、持続する放出の速度を変化させ得る。

2. 多糖類のPEG結合：

ヒアルロン酸は、以下の式8に示すような繰り返しモノマーユニットのポリマーを含む。

ヒアルロン酸



1,4-結合したN-アセチルグルコサミンおよび
グルクロン酸の交互ユニット

式 8

ヒアルロン酸は、多くの異なる方法を用いてPEGに結合し得る。好ましい方法としては、カルボキシル基の修飾およびアセチル基の修飾が包含される。PEG-ヒドラジンを用いたヒアルロン酸のカルボキシル基の修飾を示す反応スキームを、
図

8に示す。スクシンイミジル-PEG (S-PEG) によるアセチル基の修飾を示す反応スキームを図9に示す。

3. プロテオグリカンのPEG結合：

図10に示すように、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C、およびデルマタン硫酸（コンドロイチン硫酸B）は、ヒアルロン酸と同様の構造をしており、そしてヒアルロン酸を誘導体化するために用いられる方法とほぼ同じ方法を用いて、誘導体を製造することによってPEGに結合され得る。

4. ポリ乳酸のPEG結合：

エステルは、求核置換を受ける。これはカルボン酸誘導体に典型的である。攻撃は、電子が不足しているカルボニル炭素に起こる。これらの反応は、しばしば、酸の存在下で行われる。これらの酸-触媒化反応において、H⁺がカルボニル基の酸素に結合し、カルボニル炭素が求核攻撃をさらに受け易いようにする。この

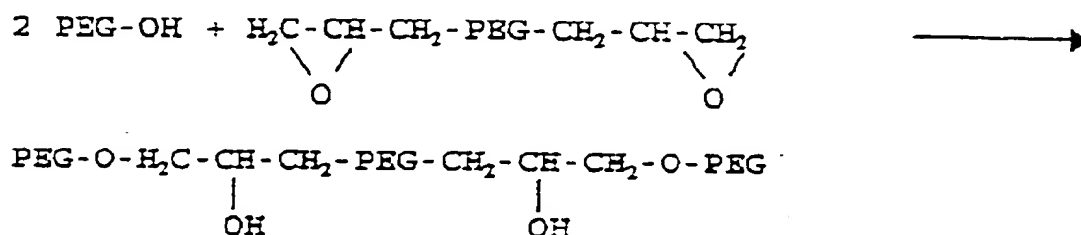
ようなことを示す反応スキームを図 1 1 に示す。

5. ポリエチレンのPEG結合:

多くの異なる活性化PEG (二官能性および多官能性の両方) が、ポリエチレンを架橋するために用いられ得る。高度に張力がかかった (highly strained) 三員環は開環が容易であるので、二官能性または多官能性のE-PEGが、ポリエチレンを架橋する

ために用いられ得る。環の結合角 (平均60度) は、通常の4面体構造の炭素の角度である109度よりかなり小さい。ポリエチレンは温度を上げてても、多くの天然のポリマー、例えば、コラーゲンと同様には容易に変性しないので、温度を上げてポリエチレンを架橋するためにE-PEGが用いられ得る。

二官能性のE-PEGとポリエチレンとの反応を以下に示す:



二官能性のS-PEGとポリエチレンとの反応を以下に示す:



ポリエチレンとE-PEGおよびS-PEGの多官能性活性化形態との反応を、それぞれ、図 1 2 および 1 3 に示す。

天然のポリマーと合成のポリマーとの間の架橋反応はインビトロで行われ得るか、あるいは反応混合物はインサイチュで架橋させるために注入され得る。十分な密度において、架橋した生体適合性結合体は軟骨に似ており、その代替物 (例えば、頭部アンレー、耳および鼻の再構築など) として有用である。天然のポリマー間で結合体を形成することに加えて、

多官能性ポリマーはまた、創傷治癒、骨形成、および免疫調節に特に適切な組成物のために、天然のポリマーと他のタンパク質 (特にサイトカインまたは増殖因

子) とを共有結合するためにも用いられ得る。このような増殖因子またはサイトカインと生体適合性ポリマー (例えば、コラーゲン) とをつなぎとめることにより、効果的に遅い放出のドラッグデリバリーシステムが提供される。天然ポリマーと合成ポリマーとの結合のためにエーテル結合が用いられ得るのに対し、サイトカインまたは増殖因子を結合するためにエステル結合が用いられ得、そしてそれによってサイトカインまたは増殖因子の遅い放出が得られる。

6. コラーゲンのPEG結合:

本発明で使用するための適切なコラーゲンには、あらゆるタイプのコラーゲン (免疫応答感受性が著しくない状態において用いられ得る天然のテロペプチド含有コラーゲンを含む) が含まれる。しかし、大多数の用途としては、非免疫原性アテロペプチドコラーゲン、特に I、II、および III 型が好まし

い。コラーゲンは溶解性であり (例えば、市販の Vitrogen[®]

100コラーゲン溶液) そしてテロペプチド領域を有し得るかまたは有し得ない。

好ましくは、コラーゲンは、再構成された

繊維性アテロペプチドコラーゲン、例えば、Zyderm[®] コラー

ゲン移植片 (Collagen Implant) (ZCI) またはアテロペプチドコラーゲン溶液 (CIS) である。種々の形態のコラーゲンが市販さ

れているか、または、例えば米国特許第3,949,073号; 同第4,488,911号; 同第4,424,208号; 同第4,582,640号; 同第4,642,117号; 同第4,557,764号; および同第4,689,399号 (すべて本明細書中で参考として援用されている) に記載の方法によって調製され得る。非繊維性コラーゲン、アテロペプチドコラーゲン、再構成されたコラーゲンは、ある種の生成物を形成するために好ましい。コラーゲンと親水性合成ポリマー (例えば、PEG) とを結合する方法は、米国特許第5,162,430号に詳細に記載されている。

本発明の組成物は、天然のポリマー、またはその誘導体 (これは、一種または複数の選択された親水性合成ポリマーに化学的に結合している) を含む。天然ポ

リマー（例えば、コラーゲン誘導体）は、親水性合成ポリマーと結合するために用いられ得る多くの利用可能なアミノ基およびヒドロキシ基を含有する。このポリマーは「連結基」を用いて結合され得る。これは天然のポリマーおよび合成ポリマー上の本来のヒドロキシ基またはアミノ基が、連結され得る前に、しばしば活性化を必要とするからである。例えば、ジカルボン酸無水物（例えば、グルタル酸無水物またはコハク酸無水物）のような化合物を用い得、ポリマー誘導体（例えば、スクシネート）を形成し得る。次いで、これは適切な脱離基によるエステル化によって活性化され得る。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N,N'-ジスクシンイミジルオキサレート、N,N'-ジスクシンイミジルカーボネートなど。さらなる連結基に

ついては、Davisの米国特許第4,179,337号もまた参照のこと。ポリマー-グルタレート組成物を形成するために用いられる現在のところ好ましいジカルボン酸無水物には、グルタル酸無水物、アジピン酸無水物、1,8-ナフタレンジカルボン酸無水物、および1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸二無水物が包含される。このようにして活性化されたポリマーは、次いで、天然のポリマーと反応して本発明の生体適合性結合体を形成する。

エステル結合による結合体

ある実施態様においては、薬学的に純粋な形態のモノメチルポリエチレングリコール（mPEG）（mw 5,000）をグルタル酸無水物（純粋な形態）と反応させて、mPEGグルタレートを作成する。次いで、このグルタレート誘導体をN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させて、スクシンイミジルモノメチルポリエチレングリコールグルタレートを形成する。次いで、スクシンイミジルエステル（mPEG'、活性化PEG中間体を示す）は、ある種の天然ポリマー上に存在する遊離アミノ基（リシン残基）と反応し得る。この反応によって、PEG分子の一つの末端が遊離しているかまたは結合していない、本発明の天然ポリマー-PEG結合体が生成する。他のポリマーは、上記のように、モノメチルPEGに置換され得る。同様に、この結合反応は、タンパク質および合成ポリマーを誘導体化するための公知のいかなる方法を用いても達成され得る。結合しているリシンの

数は、1つの残基〜リシンの100%まで変化し得、好ましくは10%〜50%であり、そしてさらに好ましくは20〜30%である。反応性リシン残基の数は、標準的な方法（例えば、TNBSとの反応）により決定され得る。

二官能性PEGを用いることにより、同一または異なる天然ポリマーあるいはサイトカインを、PEGの他の末端に結合させることが可能である。さらに、PEGと任意の天然ポリマーおよび／または他の分子とを結合させる結合は、エステル、エーテル、および／またはウレタン結合であり得、そして好ましくはエーテル結合である。

骨修復のための組成物

骨欠損または偽関節の修復に適切な処方物は、必要に応じて適切な粒子状材料と混合して、生体適合性結合体の高濃度組成物を与えることによって調製され得る。骨の修復組成物を作成するときには、コラーゲンとポリマーとの結合は、好ましくは、エステル結合の加水分解による劣化を避けるため、エーテル結合である。このような結合体／粒子状組成物は、取り込まれた液体の量に依存して、順応性または剛直であり得る。応力に耐える骨の治療のための処方物は、好ましくは乾燥され、そして剛直であり、そして一般に約45%と85%との間の粒子状のリン酸カルシウム無機質（例えば、ヒドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウム、あるいは、これらの混合物）を含有する。引張強度および剛直さは、この

組成物を真空中で約60〜90℃）好ましくは約75℃で、約5〜15時間、好ましくは約10時間、加熱することによってさらに増大され得る。順応性の組成物は、応力がかからない骨または軟骨の修復のために用いられ得る。

活性化mPEG'が、二官能性活性化PEG（dPEG'、例えば、非メチル化PEGであり、次いで各末端を活性化する）で、全体または一部置換されることにより、架橋または部分的架橋組成物が提供され得る。このような組成物は、しかしながら、従来の（例えば、熱、放射線、グルタルアルデヒドなどを用いた）架橋コラーゲン組成物とは全く異なる。それは、長鎖の親水性合成ポリマーが、組成物に対して実質的な親水性特性を与えるからである。現在の好ましい実施態様において、PE

Gの約1～20%は二官能性活性化PEGである。組成物の特性は、含まれる二官能性活性化PEGの量を変化させることによって、所望のように調節され得る。

現在の他の好ましい実施態様において、二官能性活性化PEG' (pH 7で実質的に100%) は、天然ポリマーまたはその誘導体を架橋するために用いられる。ある例において、CIS (約3～100mg/mL、好ましくは約10～40mg/mL) を、約2,000～約100,000 (好ましくは約3,400～20,000) の分子量を有するdPEG' (酸無水物の添加により各末端が活性化した二官能性PEGであって、スクシンイミドのような脱離基を有する) と反応させる (濃縮溶液として、反応混合物の最終濃度が約5～40%、好ましくは約10～20%となるように加える)。これは、

モル基準で、コラーゲンに対してdPEG' の5～10倍過剰を表す。コラーゲン分子は、機械的混合または攪拌なしでdPEG' と結合し、そして溶液から沈殿して、約20～80%の繊維性コラーゲンを含有する軟骨様のコラーゲン-ポリマー結合体を生成する。次いで、この結合体をPBSで洗浄し、残留するいかなる未反応dPEG'をも除去することによって、本発明の材料が提供される。軟骨様のコラーゲン-ポリマー結合体はまた、dPEG' 溶液 (pH 3) とコラーゲン溶液とを2本のシリンジの間で均質に混合し、次いで適切な容器 (例えば、ペトリ皿) へキャストイングすることにより調製され得る。次いで、20% w/vのdPEG' 溶液 (pH 7) を非繊維性コラーゲン-PEG溶液に加えると、少し軟骨様の繊維性コラーゲン-ポリマー結合体が生成する。得られたNFC-FC結合体軟骨は、約1～40%の繊維性コラーゲンを含有する。

最終生成物の特性は、最初の反応成分および反応条件を変化させることによって調節され得る。例えば、コラーゲン以外の天然ポリマーが用いられ得る。一般に、天然ポリマーまたはPEGの濃度が増加すると、より密度の高い、孔の殆どない生成物が得られる。コラーゲン溶液およびdPEG' 溶液のpHを変化させることによって、組成物は、繊維性コラーゲン含量が広範囲にわたって製造され得る。所望であるならば、高密度処方物は、望ましい任意の形状 (例えば、シート、膜、チューブ、円柱状、糸状物、コード、ロープなど) にキャストまたは成形され得る。いくつかの形状は、押出しにより製造

され得る。

胸部移植片

生体適合性ポリマー結合体はまた、胸部移植片のコーティングとして使用され得る。標準的なシリコンのシェル状移植片の表面は、化学的に誘導体化され、天然ポリマーと結合した二官能性または多官能性PEGのための活性な結合部位を与え得る。そして以下のような三部分結合体を得られる：（天然ポリマー-PEG-シリコン）。PEGを介してシリコンに直接結合した結合体コーティングの存在は、瘢痕組織の形成および被膜の収縮（capsular contracture）を減少させるように機能する。典型的なコートされた胸部移植片とは違って、瘢痕組織は、結合体コーティングと移植片自身の表面との間では成長できない。

あるいは、結合体は、胸部移植片シェルとして使用するための中空スフェアに形成され得る。このシェルの、次いでマンモグラフィを容易にするためにトリグリセリドのような放射線不透過物質で充填し得る。

コートされた医療用デバイス

注入可能な結合体処方物（ゲルまたは溶液）は、移植片、カテーテル、チューブ（例えば、血管代替物として）、メッシュ（例えば、組織強化のために）、糸状物などをコートするために用いられ得る。生体適合性結合体処方物はまた、白

金ワイヤをコートするために用いられ得、次いでカテーテルを介して動脈瘤部分に施され得る。ゲルは、種々のポリマー濃度および異なる反応時間で調製され得る。所望の特性が高密度、剛性、粘度、および半透明性であるときは、CISが好ましい出発材料である。しかしながら、異なる特性（例えば、高不透明性、フレキシビリティ、および移植後の細胞のコロニー化に対する感受性）を有する生成物を得るためには、繊維性コラーゲン（好ましくは、ZCIのようなアテロペプチド繊維性コラーゲン）および他の天然ポリマーが代用され得る。移植のために設計されたコーティング物品（例えば、カテーテルおよび応力に耐える骨移植片）には、CISベースの材料が現在のところ好ましい。CIS材料は、エーテル結合でPEGと結合している。

本発明の組成物（特に架橋したコラーゲン組成物）はまた、移植のための、

すなわち体内において比較的長期間残留させるためのコーティング物品に有用である。このような表面処理によって、目的物は非免疫原性となり、そして同様に異物反応の発生が低下する。従って、本発明の組成物は、カテーテル、カニューレ、骨補てつ、軟骨代替物、胸部移植片、ミニポンプおよび他の薬物送達デバイス、人工器官などに応用され得る。この応用は、架橋が起こっている間に目的物を反応混合物に浸漬し、そして粘着性の粘性コーティングを乾燥させることによって達成され得る。浸漬が不可能な場合は、反応混合物を浴びせるか、刷毛で塗るか、または塗布し得る。

あるいは、フレキシブルなシート状または膜状の形態のコラーゲン-ポリマー結合体を用いて目的物に巻き付け、隅部および端部を反応混合物で密封し得る。

他の実施態様において、目的物は、目的物が完全にコートされるまで、粘性のコラーゲン溶液浴または繊維性コラーゲン溶液中に浸漬され得る。コラーゲンでコートされた目的物をdPEG' (pH 7) 溶液浴に浸漬し、次いでコラーゲン-ポリマーでコートされた目的物を乾燥させることによって、コラーゲン溶液は目的物に固定される。あるいは、上記のように、粘性のコラーゲン溶液をdPEG' (pH 3) 溶液と混合し、そして迅速に重合させる。目的物を酸性のコラーゲン-ポリマー溶液中に浸漬し、そしてコートされた目的物を、約20重量%のdPEG' (pH 7) を含有する中和化緩衝液へ浸漬して硬化させることによって、コラーゲン-ポリマーでコートされた目的物が生成する。

コートされた移植片

胸部移植片に加えて、本発明の生体適合性結合体は、種々の異なるタイプのコートした移植片を製造するために用いられ得る。結合体は、例えば、PEGのような合成ポリマーとヒアルロン酸のような天然ポリマーとを結合させることにより形成され得る。形成された生体適合性結合体は、任意のタイプの移植片デバイスの表面上へコートされ得、そして移植片の生体適合性を改良するのに有用である。多官能性PEGを用いる

こともまた可能である。多官能性PEGを用いるとき、PEGの別の活性部位が、サイ

トカインのような生物学的に活性な化合物と結合させるために用いられ得る。三部分結合体が形成される際、それは移植片の表面上にコートされ得る。サイトカイン-PEG-ヒアルロン酸から構成される結合体が移植片の表面上に含まれると、周辺細胞の移植片への成長の統合が促進される。

コートされた移植片の好ましい実施態様に従えば、多官能性PEGのような多官能性合成ポリマーが用いられ得る。多官能性PEGの活性部位の一つは、天然ポリマー（例えば、ヒアルロン酸またはコラーゲン）と結合し、多官能性PEGの別の活性部位は、移植片表面の活性化部位と直接反応する。従って、結合体は、移植片表面に直接、共有結合している。多くの移植片は、骨を増強または修復するために、そして移植片が載置される空間内に隙間なく装着されるために用いられる。このような場合、コートされた移植片（コーティングに用いられる結合体（例えば、コラーゲン-PEG結合体）は、最初は多量の水を含む）を作製することが望ましい。コラーゲン-PEG結合体を製造しそして移植片表面にコートするときは、次いでコーティングを乾燥し得ることにより、コーティングの大きさが実質的に減少する。次いで、コートされた移植片は、修復または増強されるべき骨の所定の位置に配置され、そして再吸水して組織内で膨張する。コーティングに種々の生物学的活性化合物（例えば、サイトカインおよび増殖因子）を結

合させることに加えて、コーティングの構造的完全性を向上する助けとなり得、そしてより不規則な表面に備え得る特定の材料を含有することによって、周辺組織の統合の促進を補助することが可能である。コートされた移植片は、好ましくは、エーテル結合が形成された結合体でコートされている。これは、結合体を生体内で用いるときにはそれを維持することが好ましく、そしてエーテル結合は加水分解に対してエステル結合よりも感受性でないからである。

結合体およびサイトカインならびに／または増殖因子

生物学的に活性なサイトカインまたは増殖因子（例えば、EGFおよびTGF- β ）を含有する本発明の組成物は、適切な量のサイトカインまたは増殖因子を組成物中に混合することによって、または、サイトカインまたは増殖因子を天然ポリマーと結合させてから活性化PEGで処理することによって調製される。親水性合成

ポリマーによってサイトカインまたは増殖因子が結合した天然ポリマーからなる結合体に関して、適量の二官能性活性化PEGを用いることにより、架橋の度合いが規定され得る。

好ましくは、サイトカインまたは増殖因子を、まず、希釈溶液中でモル過剰のdPEG'と3～4時間にわたって反応させる。dPEG'を、好ましくは最終濃度が30～50倍モル過剰になるまで加え、そしてサイトカインまたは増殖因子には、好ましくは約1 μ g/mL～約5 mg/mLの濃度が与えられる。次に、生成

した結合サイトカインを、pH 7～8で、水性のコラーゲン混合物（約1～約60 mg/mL）に加え、そしてさらに反応させる。得られる組成物を、室温で一晩放置する。ペレットを遠心分離によって集め、そしていかなる非結合サイトカインまたは増殖因子分子をも除去するために、強くボルテックスをかけることによりPBSで洗浄する。

生体適合性糸状物

本発明のある実施態様では、生体適合性結合体は、長く延びた円柱または糸状物を形成するために用いられる。糸状物は、約0.10mm～約20mmの範囲の直径を有し、そしてさらに好ましくは、約0.25mm～約2.5mmの直径を有する。糸状物はいかなる長さでもよいが、好ましくは約0.25cm～約25cmの範囲の長さを有する。糸状物の長さおよび直径は、所望の用途にかなり依存する。糸状物は、結合体材料の成形または押し出しにより製造され得る。組織に溶解する糸状物は、外科用縫合糸として用いられ得、そして、加水分解することによって破壊されるエステル結合を用いた結合体から構成され得る。これらの糸状物は小片に分割され、脱水され、そして軟組織増強のために注入され得る。軟組織増強においてさらなる組織の定着を促進するために、糸状物は、他の生物学的活性成分（例えば、サイトカインまたは増殖因子）を含有するように修飾され得る。

膜状形態物

フレキシブルなシート状または膜状の形態物は、当該分野で公知の方法（例えば、米国特許第4,600,533号；同第4,412,947号；および同第4,242,291号）によ

って調製され得る。これらの方法は、本発明の生体適合性結合体を使用する膜を製造するために用いられ得る。膜を製造するために、天然ポリマー（高濃度（10～100mg/mL）CISまたは繊維性コラーゲン（好ましくは、ZCIのようなアテロペプチド繊維性コラーゲン））を平坦なシート状の容器にキャストする。mPEG'の溶液（約5,000の分子量を有する）をキャストコラーゲン溶液に加え、そして室温で一晩反応させる。生成したコラーゲン-ポリマー結合体を、滅菌スパチュラなどを用いて反応溶液から取り出し、そしてPBSで洗浄して過剰の未反応mPEG'を除去する。

次いで、得られた結合体を一定圧力をかけて圧縮し、均一な平坦シートまたはマットを形成し得る。次いで、乾燥させて本発明の膜状移植片を形成する。よりフレキシブルな膜状形態物は、より低濃度の天然ポリマー（例えば、コラーゲン）および高濃度の合成ポリマー濃縮物を用いることによって得られる。

あまりフレキシブルではない膜状形態物は、mPEG'ではなく、dPEG'溶液を用いることにより調製される。CISと緩衝溶液とを室温で混合し、そして37℃で一晩インキュベートする。生成したゲルを一定圧力をかけて圧縮し、乾燥し、そして洗浄により脱塩する。次いで、得られた膜をdPEG'で処理すること

により架橋させ、洗浄し、そして次に低温で乾燥させる。

あるいは、CISまたは繊維性コラーゲン（10～100mg/mL）を、平坦なシート状の容器にキャストする。dPEG'の溶液（22～50% w/v）をキャストコラーゲンに加える。この混合物を室温で数時間反応させる。反応時間を短くすると、よりフレキシブルな膜が生成する。得られたコラーゲン-ポリマー膜は、必要に応じて、真空オーブンにより、あるいは凍結乾燥または風乾により脱水され得る。

スポンジ

生体適合性結合体はまた、結合後の組成物の水性スラリーを凍結乾燥することによってスポンジの形態に調製され得る。

生体適合性ポリマーチューブ

本発明の生体適合性結合体は、成形または押出しによりチューブを形成するために用いられ得る。チューブは、0.25mm～約5.0cmの範囲の外径、および0.05mm

～約4.9cmの範囲の内径を有する。チューブは、一般に、それらの内径および外径に関して円形の断面を有する。チューブはいかなる長さでもよいが、一般に10mmを超える長さ、そしてさらに好ましくは10cmを超える長さを有する。チューブは、いかなるタイプの結合（エステル、エーテル、またはウレタン結合を包含する）をも有する結合体で製造され得るが、エーテル結合を用いてチューブを製造することが好ましい。チューブは、生体の種

々のタイプのチャネル（例えば、静脈、動脈、およびファロピウス管）を修復するために用いられ得る。しかしながら、チューブの使用はこれらに限定されない。

軟組織の増強

本発明の組成物は種々の用途を有する。順応性で可塑性の組成物は、皮膚の増強（例えば、皮膚の溝の充填および皮膚表面の支持）に適する注入可能な処方物として調製され得る。このような組成物はまた、括約筋組織を増強するのに（例えば、自制を回復するのに）有用である。このような場合では、処方物は、括約筋組織に直接注入されてバルクを増大し、閉塞組織（occluding tissue）をより容易に、しかも効果的に適応させる。これらの組成物は均質であり得るか、またはマイクロゲル結合体小粒子の懸濁液として、あるいは非水性流体キャリア中に送達されたビーズの懸濁液として調製され得る。ビーズ／粒子は再吸水し、そしてインサイチュで膨張する。このことは、所望の接合を行うためには注入される生成物の容量が少ないことが必要であるという点において、市販の調製物に対して有利である。

驚くべきことに、架橋が完結する前に、反応混合物は注入によって投与され得る。例えば、水性コラーゲン混合物を低濃度のdPEG'溶液と配合、混合し、そして注入を困難にする程度（通常は約20分）まで粘度が上昇する前に、配合物を注入または付与する。ルーアーロックハブを備えた2本のシリ

ジの間に、または二区画（dual compartment）を有する1本のシリンジ（例えば、二連シリンジ（double barrel））を介して混合物を通すことにより、混合が

行われ得る。組成物はインサイチュで架橋し、そして移植片を所定の位置につなぎとめながら、内因性の組織にさらに架橋し得る。この方法では、約10~100mg/mLの濃度のコラーゲン（好ましくは、繊維性コラーゲン）が用いられ得るが、約30~80mg/mLが好ましく、最も好ましくは約33mg/mLである。dPEG'の濃度は、好ましくは約0.1~約3%であるが、所望であるならば、30%程度の高濃度が用いられ得る。混合物は、増強が必要とされる部位へ直接注入され、そして炎症または異物反応を本質的に生じさせない。コラーゲンの反応混合物中に粒子材料（例えば、ヒドロゲルまたはコラーゲン-dPEGビーズ、あるいはヒドロキシアパタイト／リン酸三カルシウム粒子）がさらに含まれることによって、架橋後に、よりかさ高いまたはより剛直な移植片が提供される。

軟骨の修復

本発明の組成物は、十分稠密かつ剛直で、軟骨の代用になる形態で調製され得る。これらの組成物は、ある程度の構造を必要とする組織を修復しそして支持するために（例えば、鼻、耳、膝、喉頭、気管リング（tracheal ring）、および関節表面の再構築において）有用である。また、適切に形成された軟骨様材料を用いて、腰、靱帯、および血管とも置換し得

る。これらの適用では、材料は、一般にキャストまたは成形されて形状化される。腱および靱帯の場合は、コードまたはロープに編むために、単繊維を形成することが好ましいことであり得る。構造的完全性を増強するために、強化メッシュ（例えば、ナイロンなど）が必要に応じて取り込まれ得る。

サイトカインおよび増殖因子の投与

サイトカインおよび増殖因子を含有する本発明の組成物は、特に、創傷の治癒促進の場合のように持続的な投与に適している。骨形成誘導因子および補助因子（TGF- β を包含する）ならびに骨形態発生タンパク質（BMP）は、骨の置換、増強、および／または欠損修復のための組成物に有利に取り込まれ得る。膜形態で提供される組成物は、拒絶を抑制しそして組織成長の向上を誘導するために、移植器官を包む（wrap）またはコートするのに用いられ得る。同様に、増殖因子-ポリマー結合体およびコラーゲンの架橋反応混合物を用いて、移植のための器官

がコートされ得る。あるいは、TNF、インターフェロン類、CSF類、TGF- β などのような抗ウィルスおよび抗腫瘍因子が、それらの薬学的活性を得るために投与され得る。使用する組成物の量は、処置する状態の程度、組成物中に取り込まれた因子の量、所望の送達速度などに依存する。しかしながら、これらのパラメータは、通常の実験で（例えば、以下の実施例に挙げるモデル組成物を調製し、そして適切な実験モデルで活性化合物の放出速度をアッセイすることによ

り）、容易に決定され得る。

実施例

結合体、そのような結合体を取り込んだ処方物、物品、および移植片の作成方法の完全な開示および説明を当業者に提供するために、以下の実施例を示す。これらの実施例は本発明の範囲の限定を意図していない。使用される数値（例えば、量、温度、分子量など）に関して正確にする試みがなされているが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。他に示されていなければ、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏であり、そして圧力は大気圧または大気圧付近である。

実施例 1

（コラーゲン-PEGの調製）

（A）モノメチル-PEG5000（50g、10mmol、Aldrich Chemical Co.）を1,2-ジクロロエタン（250mL）に溶解し、そしてグルタル酸無水物（5g）およびピリジン（4mL）と共に窒素下で3日間還流状態で加熱する。次に、この溶液を濾過し、溶媒をエバポレートし、そして残渣を水（100mL）に溶解し、ジエチルエーテル（2×50mL）で洗浄する。得られるPEG-グルタレート、水中からクロロホルム（2×50mL）で抽出し、そしてこのクロロホルムをエバポレートして、PEG-グルタレート約43gを得る。次に、このPEG-グルタレートを37℃でジメ

チルホルムアミド（DMF、200mL）に溶解し、そしてN-ヒドロキシスクシンイミド（10%モルxs）を加える。この溶液を0℃に冷却し、そして当量のジクロヘ

キシルカルボジイミドをDMF溶液 (10mL) に加える。この混合物を室温で24時間放置し、次いで濾過する。次に、冷ベンゼン (100mL) を加え、そして0℃で石油エーテル (200mL) を加えることで、PEG-スクシンイミジルグルタレート (PEG-SG) を沈殿させる。この沈殿物を焼結ガラスフィルター上に集める。ベンゼンに溶解し、その後石油エーテルで沈殿させることを3回繰り返して、「活性化」PEG (PEG-SG) を与える。

Vitrogen 100[®] コラーゲン溶液 (400mL、コラーゲン1.2g、0.004mmol) を0.2Mリン酸緩衝液 (44mL) と混合し、pHを7.4まで上昇させた。次に、3倍モル過剰のSG-PEG (6.00g、1.2mmol) を、注入のため水に溶解し (40mL) 、そして滅菌濾過した。次いで、このSG-PEG溶液を上記コラーゲン溶液に加え、そしてこの混合物を17~22℃で約15時間置いた。次に、この溶液を遠心分離し、そして得られたペレット状の再構成フィブリル (25g) を集め、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、3×400mL) で洗浄して、残留したPEGを除去した。得られた材料は固形で、緊密な弾性を有し、スパチュラでつまみ上げることができる

(同等の、非結合コラーゲンである、Zyderm[®] コラーゲン移

植片はもっと流動体である)。得られた材料はPBSで希釈されることにより、濃度20.5mg/mLのコラーゲン-PEGを有する分散液を与え得る。

(B) ポリエチレングリコールの代わりにポリプロピレングリコールおよびPOE-POPブロックポリマーを用いること以外は、上記(A)と同様に行い、対応するコラーゲン-PPGおよびコラーゲン-POE-POP組成物を調製する。

(C) 二官能性PEG3400 (34g、10mmol、Aldrich Chemical Co.) を1,2-ジクロロエタン (250mL) に溶解し、そしてグルタル酸無水物 (10g) およびピリジン (4mL) と共に窒素下で3日間還流状態で加熱する。次に、この溶液を濾過し、溶媒をエバポレートし、そして残渣を水 (100mL) に溶解し、ジエチルエーテル (2×50mL) で洗浄する。得られるPEG-ジグルタレートを、水中からクロロホルム (2×50mL) で抽出し、そしてこのクロロホルムをエバポレートして、PEG-

ジグルタレートを得る。次に、このPEG-ジグルタレートを37℃でDMF (200mL) に溶解し、そしてN-ヒドロキシスクシンイミド (10%モルxs) を加える。この溶液を0℃に冷却し、そして当量のジシクロヘキシルカルボジイミドのDMF溶液 (10mL) を加える。この混合物を室温で24時間放置し、そして濾過する。次に、冷ベンゼン (100mL) を加え、そして0℃で石油エーテル (200mL) を加えることで、PEG-ジ (スクシンイミジグルタレート) (dPEG-SG) を沈殿させる。この沈殿物を焼結ガラスフィルター上に集める。ベンゼンに溶解し、その後石油エーテルで沈殿させることを3回繰り返して、「活性化」dPEG (dPEG') を与える。

Vitrogen 100® コラーゲン溶液 (400mL、コラーゲン1.2g、

0.004mmol) を0.2Mリン酸緩衝液 (44mL) と混合し、pHを7.4まで上昇させた。次に、3倍モル過剰のdPEG' (6.00g、1.2mmol) を、注入のため水に溶解し (40mL) 、そして滅菌濾過した。次いで、このdPEG' 溶液を上記コラーゲン溶液に加え、攪拌し、そしてこの混合物を17~22℃で約15時間置いた。この溶液を遠心分離し、そして得られたペレット状の再構成フィブリルを集め、PBS (3×400mL) で洗浄して、残留したdPEG' を除去した。次に、このペレットをシリンジに入れ (このシリンジはルアーロックハブで二番目のシリンジとつながっている) 、そして、均質になるまでシリンジ間を交互に通過させた。得られた材料は、溶液中に不均一なサイズのフィブリルが懸濁したマイクロゲルまたは粒子状の懸濁液である (マイクロゲル結合体) 。この材料は平滑で、柔軟な、ゴム状の固まりであり、光沢のある外観を有している。

(D) 軟骨結合体の調製:

約20重量%のdPEG' (pH7) をコラーゲン溶液 (33.8mg/mL) に加え、21℃で約16時間インキュベートした。得られた結合体を、12時間かけてPBS 100mLで3~5回洗浄した。得られた軟骨非繊維性コラーゲン-ポリマー結合体 (NFC-FC軟骨) は緊密な弾性を有する半透明の固体であった。この生成物は約20~80%の繊維性コラーゲンを含んでいた。

他のNFC軟骨組成物を、dPEG' 溶液 (0.6g、pH3) とコラーゲン溶液 (33.8mg/mL

、pH2)とを混合することにより調製した。この溶液を、ルアーロックでつなげた2本のシリンジの間を通

過させて、均質な溶液を調製した。次に、dPEG'の中和緩衝液溶液を(20% w/v)添加し、実質的に非繊維性のコラーゲン(NFC)軟骨材料とした。得られた生成物は約1~40%の繊維性コラーゲンを含んでいた。

あるいは、CISのかわりに繊維性コラーゲンを用い、不透明な外観と高い繊維含量を有する軟骨繊維性コラーゲン-ポリマー結合体(FC軟骨)を生成し得る。このようなFC軟骨は、非繊維性生体適合性結合体よりも、多孔質でかつ透過性である。

実施例2

(定性(characterization))

(A) 実施例1Aで調製したコラーゲン-mPEGを定性し、

そしてZyderm[®]コラーゲン移植片(ZCI)およびグルタルアルデ

ヒド-架橋繊維性コラーゲン(GAX)と比較した。

押出し(extrusion) :

このアッセイでは、30ゲージの針からテスト組成物を押出すのに必要とされる力を測定した。得られた結果は、滑らかにZCIを押出することができる、プランジャーの移動距離に対する必要とされる力(ニュートン)を示すグラフで表され得、必要とされる力は約20~30ニュートンであった。しかし、GAXについてグラフ化すると、力の軌跡が「スパイクング」を表し、GAXは滑らかに押出されないことが示される。押出しの間、特定の部分においては、GAXは押出しのために約10~15Nを必

要とした。これに対して、コラーゲン-mPEGは非常に低い押出し力(8~10N)を示し、スパイクングはほとんどあるいは全くなかった。

イントリュージョン(intrusion) :

イントリュージョンは、組成物が、小さな固まりとして残るより、むしろ多孔

質の床 (bed) に「指状に広がる (finger)」または流れ込む傾向の測定である。柔らかな組織の増強には、イントリュージョンが低い方が、注入した移植片が真皮を通して拡散せず、その場所に留まるので、好ましい。

30ゲージの針を取り付けた1mLシリンジの半分まで、ヒトの真皮を模した炭化ケイ素粒子 (60mesh) で満たした。このシリンジの上半分を、35mg/mLのテスト組成物 (GAX、ZCI、またはコラーゲン-mPEG) 0.5mLで満たした。次に、プランジャーをはめて、押し下げた。押し下げると、ZCIは針のところに出来た。これは炭化ケイ素床を通してのイントリュージョンを示している。GAXまたは本発明のコラーゲン-mPEGを満たしたシリンジはコラーゲンを通さず、そのかわり、緩衝液だけが放出され、イントリュージョン性 (intrudability) がないことを示した。

らせん性 (helicity) :

各組成物の部分が非らせん性を示すことを、トリプシンによる消化に対する感受性を用いて測定した。サンプルをプロ

テアーゼトリプシンで処理した。このプロテアーゼトリプシンはコラーゲタンパク質のフラグメント部分のみを攻撃し得る。加水分解の程度は、安定化したペプチドに対するフルオレサミンアッセイにより測定し、この結果を非らせん性コラーゲンの割合で表す。非らせん性コラーゲンのパーセンテージは、消化を始めてから30分後に測定した。結果は、ZCIが感受性3~10%であり、GAXが感受性1~2%であり、そしてコラーゲン-mPEGが感受性約1%であることを示した。トリプシンに対する感受性はまた、移植の後の固有の (endogenous) プロテアーゼに対する感受性と相関関係にあり得る。

コラーゲナーゼ感受性 :

各組成物のコラーゲナーゼに対する感受性もまた測定した。ZCIは65.2%消化され、それに比べて、GAXは2.2%であり、そしてコラーゲン-mPEGは45.8%であった。

相転移 :

温度に対する各組成物の挙動を示差走査熱量計を用いて試験した。加熱すると

、ZCIは約45℃および53℃に多重ピークを示した。GAXは67～70℃にピークを示した。コラーゲン-mPEGは56～61℃にピークを示した。

リシン含量：

各組成物について、1モル当たりの遊離のリシンの数を、

TNBSを用いて反応性のイプシロンアミノ基を定量することによって測定した。ZCIは、(1らせん)分子あたり約30(K/m)のリシンを含むことを示し、他方、GAXは26～27K/mであり、そしてコラーゲン-mPEGは21～26K/mであった。

(B) 架橋した生体適合性結合体の定性：

実施例1Cに記載のように調製されたコラーゲン-dPEG結合体を示差走査熱量測定法(DSC)を用いて定性した。このテストにより、コラーゲン分テの顕微鏡レベルでのフラグメンテーションの間の転移温度を測定する。転移温度が低くなることは、トリプシン感受性によって測定されたのと同様に、フラグメンテーションの増加を意味する。

コラーゲン-dPEG結合体は、DSCによって56℃に、単一の変性転移を示す。これは、実施例1Aで調製されたコラーゲン-PEG結合体の典型的な融点と同様である。比較すると、ZCIは融点45～53℃であり、多重の変性転移を示し、そしてGAXは融点67～70℃であり、単一の変性転移を示す。

実施例2Aに記載の押出しテストはコラーゲン-dPEG結合体の定性には用いることができなかった。なぜなら、この材料は30ゲージの針から押し出すことができなかったからである。

実施例2Aに記載のイントリュージョンテストを用いると、コラーゲン-dPEGの通過は炭化ケイ素の床によって完全に阻まれ、このことはコラーゲン分子が高度に架橋していること、

およびイントリュージョン性が低い、あるいはないことを示す。

実施例3

(免疫原性)

(A) 非架橋PEG-コラーゲン：

この実験は、本質的に同一の原料から調製され、そして同様の硬度を有する市販のウシコラーゲン処方物に対する、本発明のコラーゲン-mPEG調製物の相対的な免疫原性を示すために行われた。アテロペプチドコラーゲン（これは、弱い免疫原性しか有さない）を用いて両方のコラーゲン調製物を調製し、免疫応答を増大させるために、完全フロイントアジュバント（CFA）または不完全フロイントアジュバント（IFA）のいずれかと共に処方した。これは、厳しいテストであり、可能性のあるいかなる免疫反応よりも強いことを意図している。

コラーゲン-mPEGを上記実施例1Aのように調製した。雄のHartleyモルモット（11匹）に麻酔をかけ、免疫化の前の血清学的評価のために、心臓を穿刺して採血した。CFA中にエマル

ジョン化（1:9）したZyderm[®]コラーゲン移植片（ZCI）0.1mLを2回、

左および右の大腿に筋肉内注射することによって、5匹の動物を処置した。他の5匹の動物を、CFA中にエマルジョン化したコラーゲン-PEG（35mg/mL）を用いて、同様の方法で処置した。1匹の動物をIFA中のコラーゲン-PEGで処置した。免疫化から14日後、すべての動物から、再び、心臓穿刺によって採血

し、抗体滴定測定（ELISA使用）のために血清を得た。血清学的評価を、30日目に再び行った。

血清サンプルの採集から30日目に、各動物にZCIおよびコラーゲン-PEGの両方を、皮内に抗原投与した（各0.1mL、両横腹に片方ずつ）。細胞性免疫の測定値として、遅延型過敏症（DTH）を定量した。抗原投与後、24、48、および72時間後に、マイクロメーターカリパスを用いて、すべての丘疹の直径を測定し、そして紅斑および硬結の程度を記録することによってDTHを評価した。次に、この動物をCO₂で安楽死させ、そして注射した部分を切り取って、組織学的研究のために、中性に緩衝したホルマリンで固定した。

血清学的結果は、ZCIに比べてコラーゲン-PEGの方が免疫原性が低いことを示した。14日目に、ZCIで免疫化された動物の80%は「陽性」の抗体応答（14日目で力価 \geq 160）を示したのに対し、コラーゲン-PEGで免疫化した動物のうち陽性

の応答を示したのは0%であった。30日目に、ZCIで免疫化された動物はすべて高い抗体力価を示したが、コラーゲン-PEG (C-PEG) で免疫化した動物のうち高い力価を示したものはなかった。データを表1に示す。

表 1: 免疫原性

動物	治療	抗体力価	
		14日目	30日目
1	ZCI	320	>2560
2	ZCI	320	1280
3	ZCI	2560	>2560
4	ZCI	320	>2560
5	ZCI	80	2560
6	C-PEG	0	0
7	C-PEG	0	160
8	C-PEG	40	640
9	C-PEG	0	20
10	C-PEG	0	640
11	C-PEG (IFA)	0	160

DTH抗原投与に対する応答はまた、本発明のコラーゲン-mPEGは免疫原性が少ないことを示していた。ZCIで免疫化され、そしてZCIで抗原投与されたモルモットは、直径 1.128 ± 0.058 cmと測定された丘疹を示した。コラーゲン-mPEGで免疫化され、そしてコラーゲン-mPEGで抗原投与された動物は 0.768 ± 0.036 cmと測定された丘疹を示した。ZCIで免疫化され、そしてコラーゲン-mPEGで抗原投与された動物、またはコラーゲン-mPEGで免疫化され、そしてZCIで抗原投与された動物は、ZCIで免疫化され、ZCIで抗原投与された場合の丘疹と比べて、より小さな丘疹しかできなかった。各部位で、48および72時間で測定された応答は、24時間での応答と本質的に同じか、あるいは低かった。紅斑は、すべての動物において本質的に同じであった。

組織学的研究によれば、どちらの材料も、似たようなイントリュージョンを示すことが明らかとなり、真皮および皮下

の空間へ指状に広がった。ZCI免疫化動物へのZCIによる皮内抗原投与を行った部

位は、最も広範囲に渡る炎症反応を示し、この炎症反応は、好酸球および場合によっては巨細胞と共にリンパ組織炎球増多性の要素の細胞湿潤を包含する。移植部分のうち2つは、表皮を覆うびらん性の炎症および焼痂形成を示した。ZCIで免疫化された動物において、コラーゲン-mPEGで皮内抗原投与された部位は、炎症性湿潤は中程度しか集合せず、急性の細胞およびリンパ系要素は顕著に低減した。組織球および巨細胞は、より広く行き渡り、そしていくつかのサンプルにおいては、移植片を厚く覆い、かつコロニーを形成 (colonized) していた。コラーゲン-mPEGで免疫化された動物は、わずかあるいは中程度の反応しか示さず、ZCI抗原投与部位には、わずかの好酸球および巨細胞と共に、それほど多くないリンパ組織炎球増多性の脈管周囲の湿潤が伴っていた。コラーゲン-mPEG抗原投与部位には、典型的には、集合した (associated) 脈管構造の近傍の、リンパ細胞のごくわずかの散乱が伴っていた。

(B) 架橋したdPEG-コラーゲン結合体 :

コラーゲン-dPEG結合体を実施例 1 Dのように調製した。サンプルをラットの背側の表皮下および頭部のアンレーとして移植した。表皮下で、移植後30日で、NFC軟骨およびNFC-FC軟骨材料は均質な微小繊維状構造を有した。NFC-FC軟骨サンプルの周囲に、結合組織細胞の少量の (mild) コロニー化が

起こり、そして少量の被包形成が存在した。NFC軟骨材料ではコロニー化は起こらず、そして少量の被包形成が存在した。FC軟骨は十分に繊維状の構造を有し、少量ではあるが頻度の高い、結合組織細胞および少数の脂肪細胞の深いコロニー化が起こった。痕跡量の被包が、FC軟骨サンプルの限られた領域に存在した。NFC軟骨材料は、その移植前の形状を保持する傾向にあり、角の輪郭もはっきりとしていた。他方、NFC-FC軟骨サンプルは時間がたつと平らになり、かつ丸い輪郭になっていく傾向にあった。

頭部のアンレーとして移植した場合も、各材料の外観は表皮下の場合と同様であるが、骨膜と、被包または、周囲の緩やかに結合組織の形成を通して、サンプルが頭骨につなが止められ始める傾向にあった。

すべてのサンプルが明らかに生体適合性であり、宿主組織によるコロニー化の

程度が異なり、そして機械的特性が違っていた。

実施例 4

(インサイチュ架橋)

dPEG溶液を上記の実施例 1 C に記載のように調製した。次に、以下のサンプルを調製した：

(1) 5 mg の dPEG を 80 μ L の水に入れ、0.5 mL の繊維性コラーゲン (35 mg/mL) と混合し、最終 dPEG 濃度を 1 容量%としたもの；

(2) 15 mg の dPEG を 80 μ L の水に入れ、0.5 mL の繊維性コラーゲ

ン (35 mg/mL) と混合し、最終 dPEG 濃度を 3 容量%としたもの；

(3) Vitrogen[®]100 コラーゲン溶液；

(4) 5 mg の dPEG を 80 μ L の水に入れ、0.5 mL の非繊維性コラーゲン (35 mg/mL) と混合し、最終 dPEG 濃度を 1 容量%としたもの；；

(5) 15 mg の dPEG を 80 μ L の水に入れ、0.5 mL の非繊維性コラーゲン (35 mg/mL) と混合し、最終 dPEG 濃度を 3 容量%としたもの；；

(6) 5 mg の dPEG を 0.5 mL の PBS に入れ、最終 dPEG 濃度を 1 容量%としたもの；および

(7) GAX。

サンプル 1、2、4、および 5 の dPEG 溶液を、ルアーロック部品およびコネクターを備えた 1 mL のシリンジに入れ、コラーゲン材料を入れた他のシリンジと接続した。溶液を、2 つのシリンジ間を行き来させることにより混合し、均質な反応混合物を作成した。

次に、シリンジコネクターをはずし、27ゲージの針に替え、そしてこの反応混合物約 50 μ L を、それぞれ 20 匹のモルモットに皮内に注入した。サンプル 3、6、および 7 を同様に 27ゲージの針を通して投与した。注入から 30 日までの間、間隔をおいて処置部位を採取し、そして組織学的に研究した。

30 日で、すべての材料が明らかに生体適合性となった。サンプル 1 および 2 は真皮のコラーゲンファイバーとの指状突起鉗合が中程度であり、広く分散してい

た。結合組織細胞に

よるコロニー化は中程度であり、そして痕跡量の好酸球を有する丸い細胞湿潤が見られた。

サンプル 3、4、および 5 は高度に分散され、そして真皮のコラーゲンファイバーとの指状突起鉗合が微細に生じた。コロニー化は少量から中程度まで生じ、そして痕跡量レベルの細胞湿潤が見られた。

サンプル 6 は検出可能な影響はなかった。サンプル 7 は中程度のコロニー化および痕跡量から少量レベルまでの炎症を共なう、大きな島が生じた。

実施例 5

(移植片のコーティング)

コラーゲン-dPEG 反応混合物を上記の実施例 1 C に記載のようにして調製した。架橋が開始した後、チタン製移植片を反応混合物中に約 20 分間浸漬した。次いで、この移植片を、架橋を終了させ、一晩乾燥させた。

実施例 6

(コラーゲン-ポリマー-増殖因子結合体)

(A) 架橋したコラーゲン-dPEG-TGF- β 1 を含有する結合体を、以下のようにして調製した：

TGF- β 1 および 125 I-TGF- β 1 (10^5 cpm; 1 mg/mL を 25 μ L) を、 CH_2Cl_2 (100 μ L) 中の dPEG' (4 mg) の溶液に加え、そしてこの混合物を 12 分間 (サンプル # 3) または 35 分間 (サンプル # 5) 17°C で反

応させた。これにコラーゲン溶液 (3 mg/mL のアテロペプチド非繊維性コラーゲン) 2.5 mL を加え、そして得られた混合物を室温で一晩インキュベートした。形成されたベレットを、遠心分離によって集めて、コラーゲン-dPEG-TGF- β 1 を得た。

(B) 繊維性アテロペプチドコラーゲンに基づく組成物を、TGF- β 1/dPEG' の反応時間を 2 分間に限定し、そしてコラーゲン溶液の替わりに繊維性コラーゲン 7 mg を (使用前 2 分以内にコラーゲン溶液から沈殿させた) を用いたこと以外は

、上記のA項と同様にして調製した。

(C) dPEGで架橋したコラーゲンおよび遊離のTGF- β 1を含有する組成物を以下のように調製した：

CH₂Cl₂ (100 μ L) 中のdPEG' (4 mg) 溶液を、CIS (3 mg/mLのアテロペプチド非繊維性コラーゲン) 2.5 mLに加え、そして得られた混合物を室温で一晩インキュベートした。形成されたペレットを洗浄して未反応のdPEG'を除去し、そしてそれにTGF- β 25 μ gを混合してコラーゲン-dPEG+TGF- β 1を得た。

(D) 結合するTGF- β 1の割合を以下のように測定した：

未結合のTGF- β 1を除去するために、上記のA項～C項において調製された各組成物に、激しくボルテックスをかけて、次いで遠心分離することで、緩衝液 (0.02Mのリン酸緩衝液、0.1% BSA) 0.5 mLで6回洗浄した。ペレットおよび上清を洗浄操作毎に集め、そして数えた。結果は、単純な混合物におけるTGF- β 1は洗浄約6回以内に定量的に放出されるのに対し、B項の組成物ではTGF- β 1約40%が保持され、そしてA項の組成

物では50%が保持されることを示すグラフとして表し得る。

(E) 上記で調製された材料の生物学的活性を以下のようにアッセイした：

A項 (CIS-dPEG-TGF- β 1) (TGF- β 1/dPEG'の反応時間12分) およびC項 (CIS-dPEG+TGF- β 1) に従って調製された組成物を調製し、さらにTGF- β 1 (CIS-dPEG) を用いずに、C項に従って調製したコントロールを調製した。これらのサンプルをD項に記載のようにPBS/BSAにおいて8回洗浄し、次いで37℃で胎仔ウシ血清 (Gibco) によってさらに3回洗浄した。この洗浄プロトコルによって、視覚的に検出可能な材料の損失が生じたので、残留したTGF- β 1含量は残留した¹²⁵Iを数えることによって測定した。次いで、TGF- β 1活性をELISAによってアッセイした。この結果を以下の表2に示す。

表 2. 生物学的活性の保持力

サンプル:	^{125}I 計数	残留の TGF- β 1 (μg)	O.D. (414 nm)
CIS-dPEG	0	0	0.015 0.015
CIS-dPEG + TGF- β 1	2775	0.5-1.0	0.029 0.035
CIS-dPEG-TGF- β 1	42604	7.4	0.102 0.082

このデータは、本発明の組成物に保持されているTGF- β 1が実質的に活性な形態を維持することを示す。

実施例 7

(処方物)

(A) 注入による移植に適切な処方物を、注射用滅菌水にコラーゲン-PEGを35 mg/mLで懸濁することにより、調製した。得られた処方物の性質を上記の実施例 2 に記載する。

(B) 応力に耐える骨の欠損（例えば、骨折、偽関節など）の修復に有用な処方物は、本発明のコラーゲン-PEGと適切な粒子状の不溶性成分とを混合することにより調製され得る。この不溶性成分は、繊維性架橋コラーゲン、ゼラチンビーズ、ポリテトラフルオロエチレンビーズ、シリコーンゴムビーズ、ヒドロゲルビーズ、炭化ケイ素ビーズ、無機質ビーズ、またはガラスビーズであり得、好ましくは、カルシウム無機質、例えば、ヒドロキシアパタイトおよび／またはリン酸三カルシウムである。

固形の処方物を、Zyderm[®] II コラーゲン(65mg/mLコラー

ゲン) またはコラーゲン-mPEG (63mg/mL) と粒子状ヒドロキシアパタイトおよびリン酸三カルシウム (HA+TCP) とを混合し、そして空気乾燥して、65重量%のHAを含有する固いブロックを形成することによって調製した。必要に応じて、プロ

ックを75℃で10時間加熱することによって加熱処理した。得られたブロックを試験前12時間0.13Mの生理食塩水で吸水させた (hydrate)。

drate)。

その間、PEG-コラーゲン-HA+TCP (PC-HA) 組成物は1相のみ
まであるのに対して、Zyderm[®] -HA+TCP (Z-HA) 組成物は3相

に分かれたことが観察された。

各ブロックを、5%伸長し、解放後、その応力緩和を1分間モニターした。この試験の後、各ブロックを、破損するまで、1cm/分の一定の割合で伸長した。

この結果を表3に示す：

表3：機械的強度

サンプル	ピーク 力	応力緩和		一定の伸長	
		一定 力	時間 (分)	破損 力	破損時の伸長
Z-HA (空気)	1.5 -	1.1 -	0.04 -	2.6 2.6	11.0% 15.3%
Z-HA (熱)	1.5 1.4	1.1 1.0	0.06 0.07	- 3.4	- 14.0%
PC-HA (空気)	2.6 2.8	1.8 2.1	0.06 0.08	5.5 5.4	12.3% 11.7%
PC-HA (熱)	3.3 3.6	2.6 2.7	0.04 0.06	5.4 5.4	12.0% 20.3%

全ての力は、ニュートンで記載した。破断（引張）における伸度は、%伸度で記載した。

このデータは、コラーゲンポリマーが、実質的により大きな引張強度を示すHA+TCP組成物を形成することを示す。このように、同量の非結合コラーゲンを用いた組成物より実質的に強い、コラーゲンポリマーを有する移植片組成物が調製され得るか、または用いるコラーゲンポリマーの量を低減して同様の強度の

組成物が形成され得る。

実施例 8

(ヒアルロン酸と二官能性SC-PEGとの架橋)

ヒアルロン酸ナトリウム (LifeCore Biomedicalから入手)

1 g を、PBS 15ml に加え、一晚溶解させて、均質な溶液を形成した。このヒアルロン酸/PBS 溶液 5ml を、シリンジーシリンジ混合を用いてPBS 0.5ml 中の二官能性SC-PEG 50mg と混合した。

得られた材料をシリンジからペトリ皿に押出し、そして37℃で16時間インキュベートした。次いで、この材料を室温で8時間冷却させた。24時間後、この材料は、架橋したゲルを形成した。

S-PEG を含有しないヒアルロン酸を、この実験のコントロールとして用いた。同一のインキュベーション時間の後、このコントロールはまだ流体で流動的であった。

実施例 9

(平滑なコラーゲン-ポリマーチューブの調製)

Zyderm[®] I コラーゲン (35mg/ml、Collagen Corporation,

Palo Alto, California から入手可能) を含有する内径4.5mmの標準的なシリンジの針の末端を切断した。このシリンジのプランジャーを用いて、このコラーゲンを、切断したシリンジから押出して、固い円柱状にした。コラーゲンの円柱をペトリ皿に載せ、そして二官能性S-PEGの10%溶液 (PES 10ml 中の二官能性S-PEG 1.0g) 中に浸漬した。

このコラーゲン円柱を室温で10% S-PEG 溶液中でインキュベートした。コラーゲン円柱の外側から内側に、PEGが拡散するように、架橋反応が生じる。S-PEG 溶液中でのインキュベーション

の20~30分後、コラーゲン円柱の外側は架橋されており、内側は架橋されていないままであった。

インキュベーションの20～30分後、コラーゲン円柱を架橋剤溶液から取り出した。内側の架橋していないコラーゲンは、手による圧力を用いて、外側の架橋したシェルから容易にしぼり出され得、PEGで架橋されたコラーゲンの中空のチューブが残る。

次いで、中空のチューブを、10% S-PEG溶液に戻し、架橋プロセスを完了させるために、37℃で一晩インキュベートした。

中空のPEG-コラーゲンチューブの外径は、コラーゲン円柱である出発材料のサイズを変化させることによって、変えられ得る。このチューブの内径は、PEG溶液中でのコラーゲン円柱の最初のインキュベーションの時間の長さを短くすることによって、増大され得る。逆に、チューブの内径は、最初のインキュベーション時間を長くすることにより、小さくされ得る。

実施例 10

(ひだを有する (pleated) コラーゲン-ポリマー

チューブの調製)

平滑なコラーゲン-ポリマーチューブを実施例 9 に記載の方法に従って調製した。まだ湿潤なうちに、このチューブを 1y

derm ⑤ I コラーゲンの出発材料を初めに含有していたのと同

様のシリンジのプランジャーに滑らせてかぶせた。チューブ

はシリンジのプランジャーにぴったりと適合していた。次いで、PEG-コラーゲンチューブをシリンジのプランジャーの軸に沿って押し下げ、湿潤なチューブに、ひだ、または、うねを形成した。その結果、そのとき、ひだを有するチューブは、元の平滑なチューブの長さの約半分となった。

シリンジのプランジャーにかぶせたままの状態、ひだを有するPEG-コラーゲンチューブを、室温で煙霧フード (fumehood) 下で乾燥した。24 時間後、乾燥したひだを有するチューブをシリンジのプランジャーから押出してはずした。このチューブは、シリンジのプランジャーからはずした後も、ひだを有する形状を維持していた。

次いで、このひだを有するPEG-コラーゲンチューブを水を入れたペトリ皿に載せた。このチューブは、再吸水の後もひだを有する形状を維持していた。

実施例 1 1

(小さい直径のひだを有する

コラーゲン-ポリマーチューブの調製)

シリンジ-シリンジ混合を用いて、Zyderm[®] I コラーゲン

0.9ccを、二官能性S-PEGの5%溶液 (PBS 0.1cc中S-PEG 5mg) 0.1ccと混合した。混合に引き続いて直ちに、PEG-コラーゲン材料を、18ゲージの針を用いて、TFEチューブ (外径1.5mm、内径1.3mm) 中に押出した。(小さい直径の円柱形状を維持する

ために、一定量のPEGを加えて、Zyderm[®] I コラーゲンのみ

の場合より大きな構造的完全性を有する出発材料を提供することが必要であった。)

室温でのインキュベーションの20~30分後、チューブを切って開け、そしてPEG-コラーゲンの固い円柱を、このチューブから剥がした。次いで、PEG-コラーゲン円柱を、二官能性S-PEGの10%溶液5ccを入れたペトリ皿に載せた。PEGが、コラーゲン円柱の外側から内側に拡散するように、架橋反応が生じる。室温において、S-PEG溶液中で3時間インキュベーションした後、円柱の内側を、直径1mmのマンドレルを用いて押出し、中空で平滑なPEG-コラーゲンチューブを得た。

次いで、PEG-コラーゲンチューブをマンドレルの軸に沿って押し下げ、湿潤なチューブに、ひだ、または、うねを形成した。その結果、ひだを有するチューブは、そのとき、元の平滑なチューブの長さの約半分であった。

マンドレルにかぶせた状態のままで、ひだを有するPEG-コラーゲンチューブを、室温で煙霧フード下で乾燥した。24時間後、乾燥したひだを有するチューブをマンドレルから押しはずした。このチューブは、マンドレルからはずした後も、ひだを有する形状を維持していた。

次いで、このひだを有するPEG-コラーゲンチューブを水を入れたペトリ皿に入

れた。このチューブは、再吸水の後もひだを有する形状を維持していた。

種々の直径のPEG-コラーゲンチューブは、種々のサイズのTFEチューブを用い、そして架橋反応が生じる時間を変化させ

ることによって、調製され得る。

実施例 1 2

(薄い管壁を有する (Thin-Walled)

チューブの調製)

シリンジ-シリンジ混合を用いて、Zyderm[®] I コラーゲン

0.90mlを、PBS 0.10ml中の二官能性S-PEG 10mgの溶液と混合した。

内径0.9mmを有するTFEチューブを、内径1.2mmを有する他のTFEチューブの中に入れた。PEG-コラーゲン混合物を、内側のチューブと外側のチューブとの間の空間に27ゲージの針によって注入した。次いで、このチューブを37℃で2時間インキュベートした。

外側のチューブを引き抜き、そして周りにPEG-コラーゲンのシェルを有する内側のチューブを、さらに2時間、37℃でインキュベートした。

次いで、薄いPEG-コラーゲンのシェルを内側のTFEチューブから注意深く押しはずした。得られたPEG-コラーゲンチューブは、透明でセロファン様の硬度であった。

次いで、PEG-コラーゲンを、水中に置いて再吸水させた。このチューブは非常に薄く、そして小さい直径を有していたが、このチューブを用いて水を注入することができた。

このチューブの管壁の厚みおよびコラーゲン-ポリマーチューブの内径は、コラーゲン-ポリマー材料を成形するために用

いられる内側および外側のTFEチューブのサイズを変化させることによって、変えられ得る。上記の方法によって製造される薄い管壁を有するチューブは、神経再生を促進するための神経ガイドチューブとしての使用に、特に適し得る。

実施例 1 3

(PEG-コラーゲン糸状物の調製)

シリンジ-シリンジ混合を用いて、Zyderm[®] I コラーゲン

(35mg/ml) 5mlを、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 0.5ml中の二官能性SG-PEG 50 mgと混合した。直ちに、この材料を直径1.5mm

または3.5mmのいずれかのTeflon[®] チューブに移し、次いで、

37℃で16時間インキュベートした。架橋したコラーゲンを、チューブから取り出して、一晚乾燥した。乾燥中、糸状物をぴんと張り、糸状物が軸状の次元より、放射状の次元で、乾燥することを確実にした。

Zyderm[®] I コラーゲン 5mlとPBS 0.5mlを混合することに

よって、架橋していないコラーゲン糸状物をコントロールとして製造した。上記の方法を用いて2つの異なる直径の糸状物を製造した。

糸状物の直径、長さ、および重量を、新鮮な(湿潤)状態、脱水した状態、および再吸水した状態において測定した。これらの測定の結果を図1のグラフ、および、図14に示す表に表した。

架橋していない糸状物は親水性PEGを含有していないので、

水を留めておくことができず、再吸水し得ない。従って、再吸水した状態でのこれらの糸状物の測定値は得られなかった。これらの糸状物は、再吸水によって、元の長さの全てを維持しており、元の直径および重量のほとんど全てを維持していた。

種々の粘弾性的測定を、脱水した状態における架橋した糸状物および架橋していない糸状物について行った。粘弾性的評価の前に、全ての糸状物を20mmの一定の長さに切断した。結果を図15に示す表に表した。糸状物の膨張能を示す棒グラフを、図1に示す。4つの糸状物のタイプそれぞれにおける数種の粘弾性的測定の、標準偏差を示すエラーバーを有する棒グラフを図2～5に表す。

引張応力 (N/mm^2) は、糸状物の破損 (破断) における力を断面積の関数として測定した値である。ひずみ (Δ 長さ / 長さ) および Δ 長さは、糸状物の弾性の測定値である (張力下でどのくらい伸長するか)。ヤング率 (N/mm^2) は、応力をひずみで割ることによって算出される。これは特定の材料の粘弾性的な「指紋」として知られている。

図 2 ~ 5 における棒グラフは、架橋していない糸状物について得られた粘弾性的な測定値の大きな標準偏差および変動を例示しており、架橋していない材料が不均質であることを示す。PEG-架橋した糸状物によって得られた一様な結果は、PEG架橋が、均質性、ならびに、より大きな機械的強度および弾性を、コラーゲン材料に与えることを示す。

実施例 1 4

(コイル状の糸状物の調製)

二官能性 S-PEG 1 % 溶液中のコラーゲンを 18 ゲージの針によって TFE チューブ (外径 0.9 mm、内径 0.6 mm) 中に注入することによって、実施例 1 3 に記載のように、小さい直径の架橋したコラーゲン糸状物を製造した。

チューブから取り出した後、湿潤な糸状物を外径 1.5 mm を有する第 2 の TFE チューブの回りにコイル状に巻き付けた。コイル状の糸状物を煙霧フード下で室温にて 2 日間チューブ上で乾燥した。

脱水した PEG-コラーゲンコイルを、チューブから押してはずした。乾燥状態のコイル状の糸状物を、手でまっすぐに引っ張った。このときのまっすぐな糸状物を水に浸漬すると素早く再吸水によってコイル状の形状に戻った。

コイル状の湿潤な糸状物を水浴から取り出し、引っ張り、そして張力下でまっすぐの状態に乾燥した。まっすぐの状態に乾燥した糸状物を水に再び浸漬すると再吸水によって元のコイル状の形状に再び戻った。

コラーゲン-ポリマーコイルをまっすぐに引っ張ると針またはカテーテルによる送達を促進し得る。これらのコイルは、再吸水によってコイルの形状になる能力および中空を満たすように膨張する作用のために、動脈瘤の治療に特に有用である。

上記の実施例は、コラーゲン-ポリマー材料の「記憶」を例示している。吸水によって、この材料は最初に乾燥したときの元の形状に戻る。

実施例 1 5

(PEG-コラーゲン材料の粘弾性的特性)

活性化二官能性SG-PEGの10%溶液を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1ml中で100mgの粉末の二官能性SG-PEG (3400ダルトンMW) を希釈することによって調製した。10%二官能性SG-PEG溶

液1mlを、Zyderm[®] I コラーゲン (Z-I、35mg/ml) と混合して、

最終的なPEG濃度を1%とした。コラーゲンおよび架橋剤溶液を10mlシリンジに入れ、そしてシリンジ-シリンジ混合を用いて混合した。

Zyderm[®] II コラーゲン (Z-II、65mg/ml) を、上記と同様の

方法を用いて、二官能性SG-PEGで架橋した。

Z-I-PEGとZ-II-PEGとの複合体を含有するシリンジを、37℃で16時間インキュベートし、そして重合したゲルを形成した。

2つのシリンジのそれぞれの針の末端を切り取り、そしてゲルをそれぞれのシリンジのプランジャーを用いてシリンジの筒内から押出した。次いで、固いゲルを2mmの厚みの円板状に薄く切り、脱水し、次いで再吸水した。円板の直径、厚み、および重量を、新鮮な (湿潤) 状態、脱水した状態、および再吸水した状態で測定した。これらの測定の結果を図16に示す表に表した。

架橋したコラーゲンの円板 (両方のコラーゲン濃度において) は、再吸水によってほとんど元の寸法にまで回復した。

実施例 1 6

(白金ワイヤのコーティング)

リドカインを含まないZyderm[®] II コラーゲン (65mg/ml、

Collagen Corporation, Palo Alto, CAから入手可能) を、滅菌濾過したリン

酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて32.5mg/mlまで希釈した。活性化二官能性S-PEGの10%溶液を、滅菌濾過したPBS中で粉末の二官能性S-PEGを希釈することにより調製した。S-PEG 100 μ lを、コラーゲン900 μ lに加えて最終S-PEGを濃度1%とした。S-PEG溶液およびコラーゲンを3mlシリンジに入れ、そしてシリンジ-シリンジ混合を用いて混合した。

マンドレル (コイルをまっすぐに保つための内側のワイヤ) 上で直径0.25mmのコイル状にした白金ワイヤ (#1, Target Therapeutics, Santa Clara, CAから入手可能) を、超マイクロピペットチップ (0.5~10 μ l) の内側に、チップ1個につきコイル1個を装填した。その結果、マンドレルはピペットチップの狭い開口部および広い開口部の両方を通過した。シリンジ中のS-PEG-コラーゲン混合物を、22ゲージの針を用いて各ピペットに注入した。

コイルを装填したピペットを、ペトリ皿に載せ、そして37℃で24時間インキュベートした。コイルを装填したチップを、室温で6日間層流フード (laminar flow hood) 下に置いた。次

いで、コートしたコイルをピペットチップから取り出した。

乾燥時間が適切でない場合には、コーティングはコイルにうまく接着しない。

コートしたコイルは、Tracker[®] 325iカテーテル (Target Therapeutics) または他の同様のタイプのカテーテルを用いて送達され得る。

実施例 17

(白金ワイヤのコーティング)

リドカインを含まないZyderm[®] II コラーゲンを、滅菌濾

過したPBSを用いて32.5mg/mlまで希釈した。活性化二官能性S-PEGの10%溶液を、滅菌濾過したPBS中で粉末の二官能性S-PEGを希釈することにより調製した。S-PEG溶液100 μ lを、コラーゲン900 μ lに加えて最終S-PEG濃度を1%とした。S-PEG溶液およびコラーゲンを3mlシリンジに入れ、そしてシリンジ-シリンジ混合を用いて混合した。

マンドレル上のコイル状の白金ワイヤを直径1mmのTeflon

⑤ チューブの内側に入れた。シリンジ中のS-PEG-コラーゲン

混合物を、22ゲージの針を用いてコイルを覆うチューブ中に注入した。プラグをチューブの末端に挿入し、そしてこのチューブを棚に置いてチューブの中央にコイルの末端をまっすぐに保持した。この棚を37℃のインキュベーター内に16時間置いた。

チューブを、インキュベーターから取り出した後、外科用

メスで側面を切り、コイルから剥がした。コートしたコイルを室温で数時間空気乾燥させ、次いで、マンドレルから取りはずした。

コートしたコイルは、カテーテルによって送達され得る。

本発明は、最も実用的で、そして好ましい実施態様と考えられることに対して本明細書中で示され、そして記載されている。しかし、これらからの逸脱は、本発明の範囲内で行われ得、明らかな変更は、この開示内容を読むことにより当業者により行われ得ることが理解される。

実施例 18

(テロペプチド含有コラーゲン-ポリマー結合体の調製)

テロペプチド含有コラーゲンおよびアテロペプチドコラーゲンを、二官能性活性化SG-PEG (MW=3400ダルトン) を用いて架橋した。得られた材料の物理的特性を比較した。

PEGで架橋したテロペプチド含有コラーゲンの調製

雌ウシの皮のスラリー (ペプシン消化の直前にサンプリングした) 900mlを、水浴中で1時間で17℃に安定化させた。0.2Mリン酸緩衝液 (pH11.4) 100mlを、速く攪拌しながら皮のスラリーに加えた。この材料を17℃で16時間インキュベートした後、遠心分離を行い、テロペプチド含有コラーゲンのベレット91gを製造した。ベレットのタンパク質濃度は、ビウレット法を用いて40mg/mlと測定された。

ペレットのサンプル3mlを0.1M塩酸 (HCl) 0.5mlを加えることによって酸性化した。得られた材料は、極めて不透明であり、そして酸性 (pH 4~5) で繊維状であった。酸性化したテロペプチド含有コラーゲン0.5mlを型内に入れ、そして濃度35.7% (重量%/容量%) の二官能性活性化SG-PEG溶液0.25mlを加えた。コラーゲンおよび架橋剤溶液が入っている型を一晚37℃でインキュベートした。架橋は、PEG溶液がコラーゲングル中に拡散するにつれて、生じた。しっかりと架橋したテロペプチド含有コラーゲングルの5つの小片 (30mm×10mm×厚み2mm) が得られた。

PEGで架橋したアテロペプチドコラーゲンの調製

Zyderm[®] II コラーゲン (濃度65mg/ml, Collagen Corpora

tion, Palo Alto, CAから入手可能) を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて40mg/mlの濃度まで希釈した。得られた40mg/mlのアテロペプチドコラーゲン3mlを酸性化し、そして上記の方法によって二官能性活性化SG-PEGを用いて架橋した。しっかりと架橋したアテロペプチド含有コラーゲングルの5つの小片 (30mm×10mm×厚み2mm) が得られた。

フィブリルの形成

テロペプチド含有コラーゲンのペレット3mlおよびZyderm II コラーゲン3mlを上記と同様にして酸性化した。2種類の酸性化したコラーゲン材料各0.5mlを型内に入れた。酸性化し

たテロペプチド含有コラーゲンおよびアテロペプチドコラーゲンが入った型を、37℃で一晩インキュベートした。

37℃で一晩インキュベートした後、中程度に架橋したテロペプチド含有コラーゲングルが得られた。アテロペプチドコラーゲンは、いかなる架橋したゲルも製造しなかった。

示差走査熱量測定法 (DSC)

示差走査熱量測定法 (DSC) を用いて材料の熔融温度を測定する。架橋していないテロペプチド含有コラーゲンおよびPEGで架橋したテロペプチド含有コラー

ゲンについてのDSCの測定結果を、以下に示す表4および図6および7に表す。

表4. DSC測定

材料	ピーク	T_m (°C)
アテロペプチドコラーゲン	二重線	45, 55
テロペプチド含有コラーゲン	二重線	52, 57
架橋したアテロペプチドコラーゲン	一重線	59
(シャープ)		
架橋したテロペプチド含有コラーゲン	ブロード	66 /

架橋していないアテロペプチドコラーゲンは、2つの温度転移ピーク（1つ目は約46℃および2つ目は約54℃）を示す。架橋していないテロペプチド含有コラーゲンもまた、2つの温度転移ピーク（1つ目は49℃に生じ、そして2つ目は57℃に生じた）を有する。テロペプチド含有コラーゲンについてのピークは、アテロペプチドコラーゲンについてのピークよりブロードである。なぜなら、テロペプチド含有コラーゲンは固有の架橋を含有するからである。この架橋は酵素処理の間に取り除かれ、得られる精製されたアテロペプチドコラーゲンには存在しない。

アテロペプチドコラーゲンを二官能性活性化S-PEGで架橋するとき、転移温度は約58℃に上昇し、そして一重線のピークとして現れる。テロペプチド含有コラーゲンを二官能性活性化S-PEGで架橋するとき、転移温度は約66℃まで上昇し、そして一重線の転移ピークからなる。このピークは、PEGで架橋したアテロペプチドコラーゲンについての同等の転移ピークより幾分かブロードである。架橋したテロペプチド含有コラーゲンについて得られたブロードなピークは、架橋したアテロペプチドコラーゲン（これは酵素処理および精製の結果としてさらに均質となる）と比較すると、固有の架橋の結果として増加する不均質性のためであると考えられる。

粘弾性的特性

架橋していないおよび架橋したテロペプチド含有コラーゲ

ンおよびアテロペプチドコラーゲンを、引張強度 (N)、引張応力 (N/mm²)、ひずみ ($\Delta L/L$)、およびヤング率 (N/mm²) について試験した。粘弾性的試験の結果を図 17 に示す表に表す。

引張応力 (N/mm²) は、材料の破損 (破断) における力を断面積の関数として測定した値である。ひずみ (Δ 長さ / 長さ) は、材料の弾性の測定値である (張力下でどのくらい伸長するか)。ヤング率 (N/mm²) は、応力をひずみで割ることによって算出される。これは、特定の材料の粘弾性的な「指紋」として知られている。

図 17 の表におけるデータによって示されるように、架橋したテロペプチド含有コラーゲンは、架橋したアテロペプチド材料より著しく強い。

膨張能

架橋していないおよびPEGで架橋したテロペプチド含有コラーゲンおよびアテロペプチドコラーゲンを、膨張能について試験した。データを表 5 に表す。

表 5. 膨張能のデータ

材 料	元の 湿潤 状態の 重量 (g)	脱水した 状態の 重量 (g)	再吸水した 状態の 重量 (g)
アテロ	0.175	0.009	---
テロ	0.325	0.027	0.207
アテロ-PEG	0.166	0.020	0.084
テロ-PEG	0.398	0.026	0.409

架橋していないアテロペプチドコラーゲンはゲルではないので、水に浸漬したときにこの架橋していないアテロペプチドコラーゲンはばらばらに壊れる。従って、再吸水した重量の値を得ることはできない。

データによって示されるように、PEGで架橋したテロペプチド含有コラーゲンは、架橋したアテロペプチドコラーゲンより良好な再吸水特性を示し、再吸水後に元の湿潤な重量の100%に回復した。

本発明は、最も実用的で、そして好ましい実施態様と考えられることに対して本明細書中で示され、そして記載されている。しかし、これらからの逸脱は、本発明の範囲内で行われ得、明らかな変更は、この開示内容を読むことにより当業者により行われ得ることが理解される。

【 図 1 】

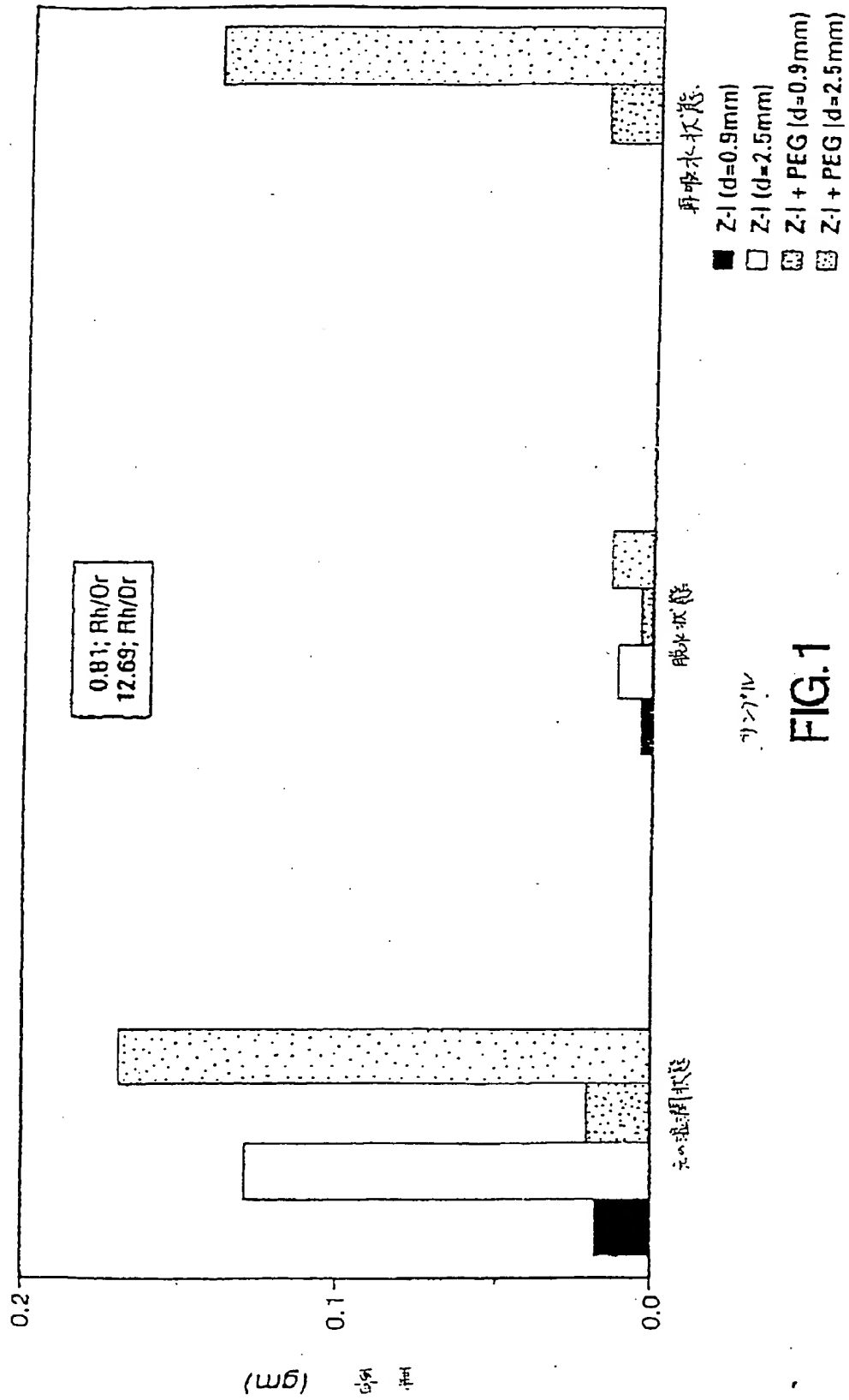


FIG.1

【 図 2 】

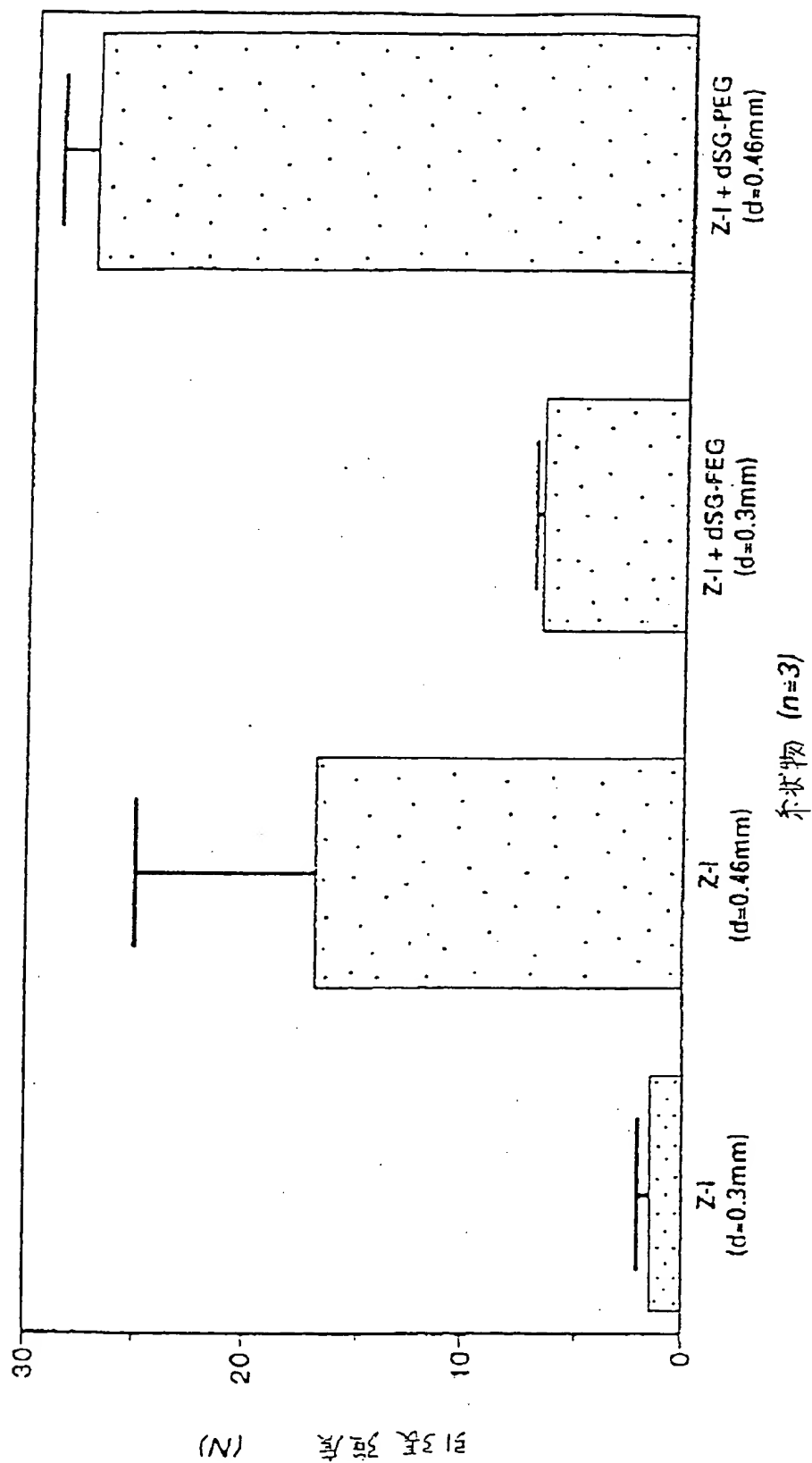
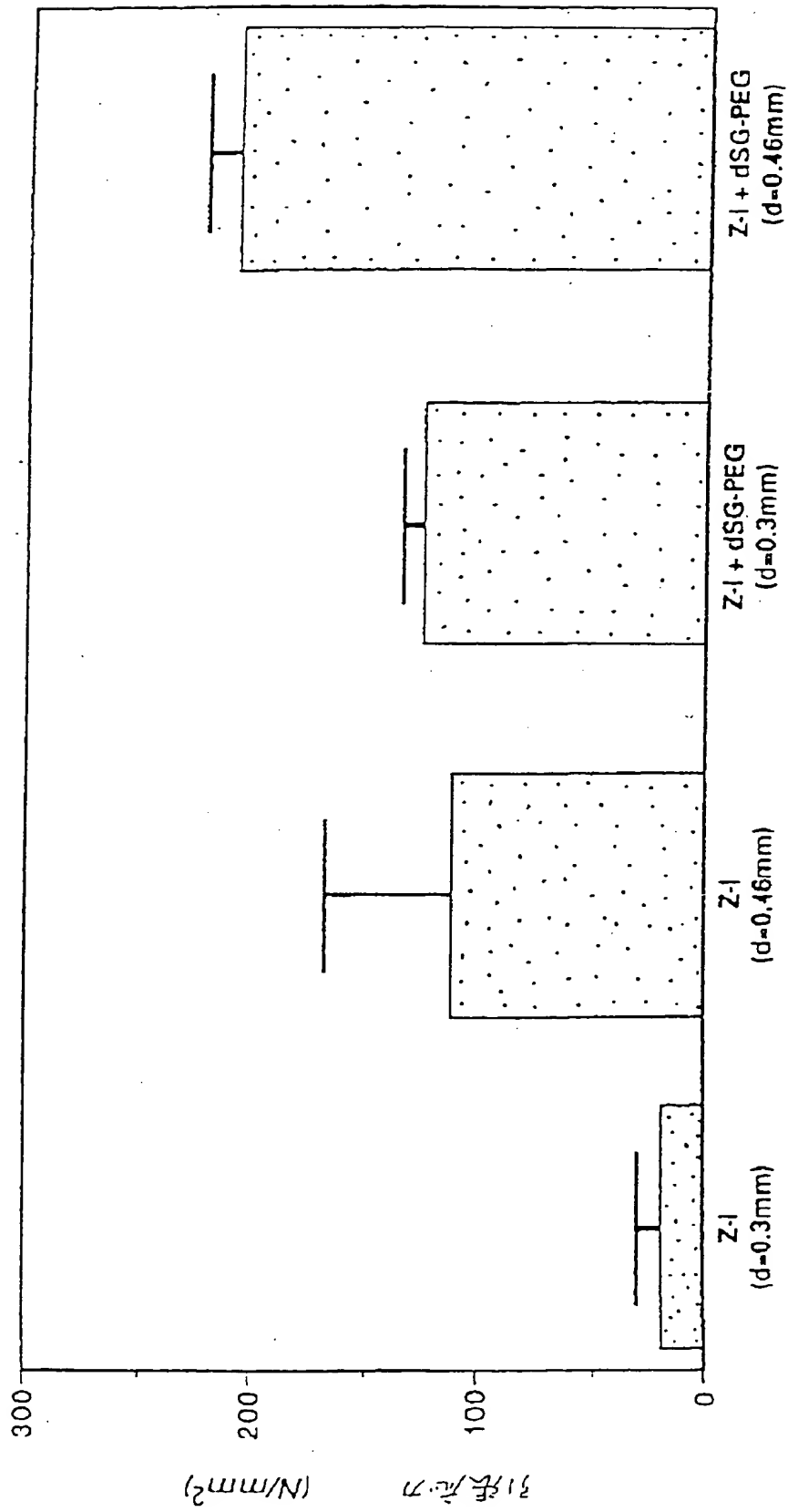


FIG.2

【 図 3 】



糸状物 (n=3)

FIG.3

【 図 4 】

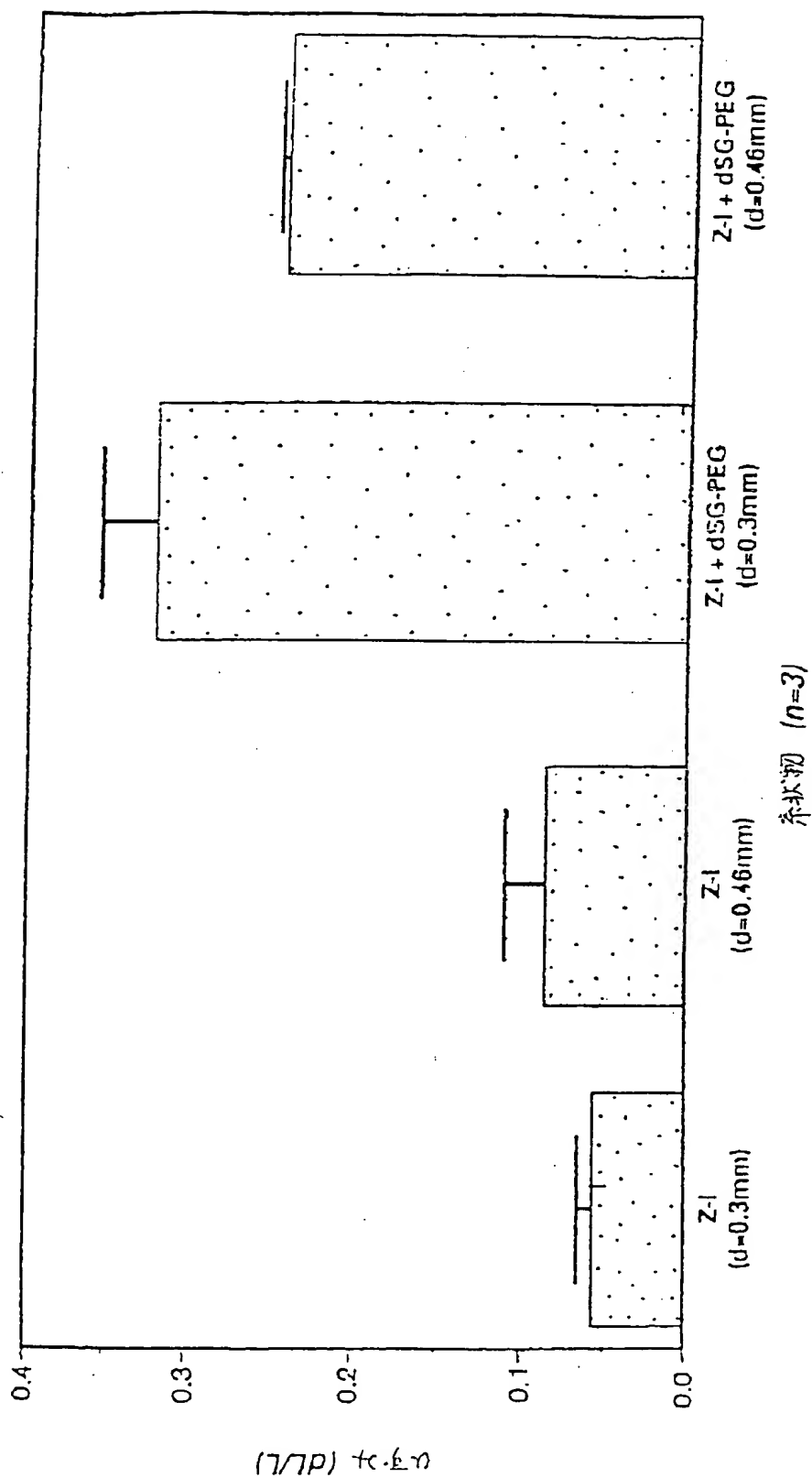


FIG.4

【 図 5 】

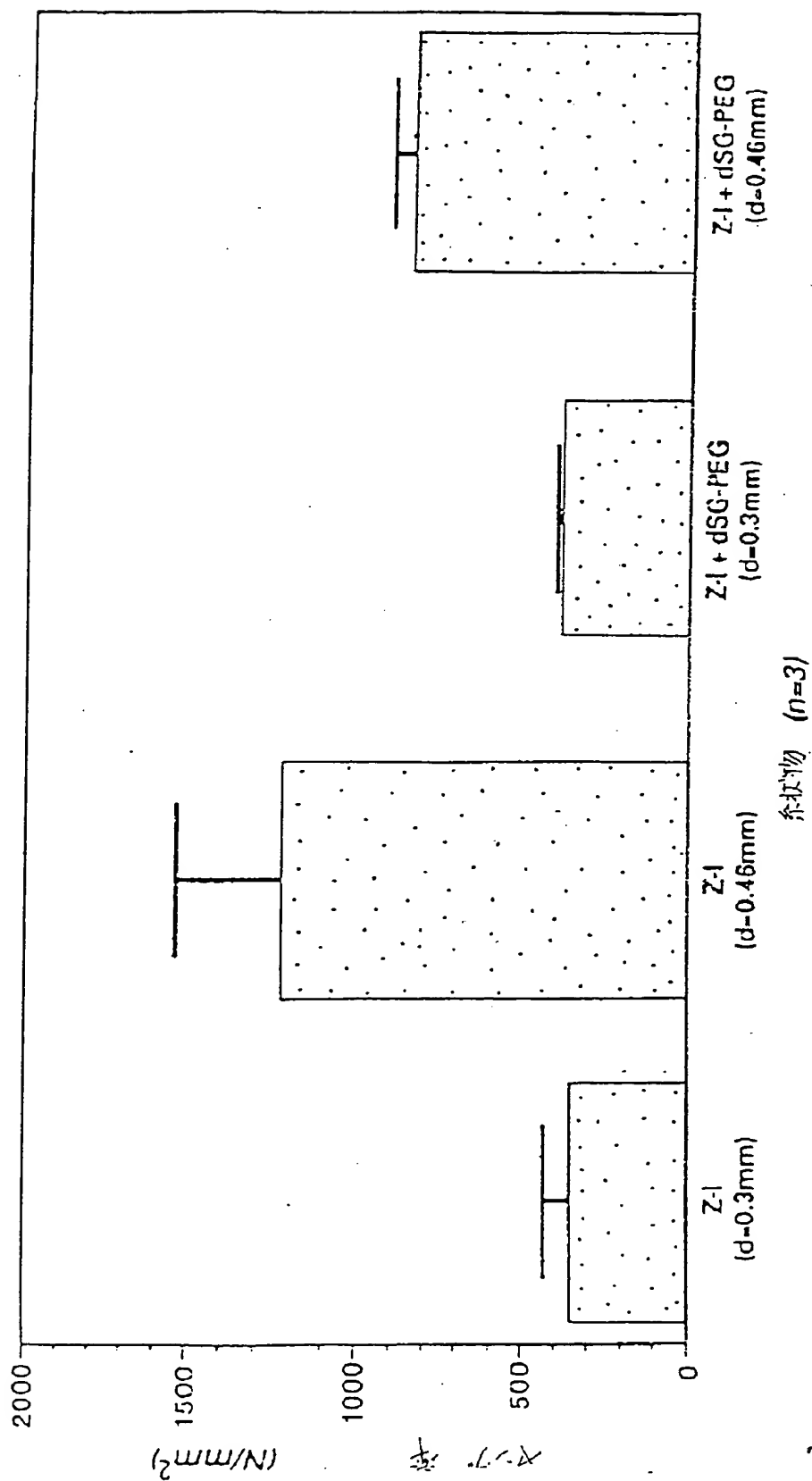


FIG.5

【 図 6 】

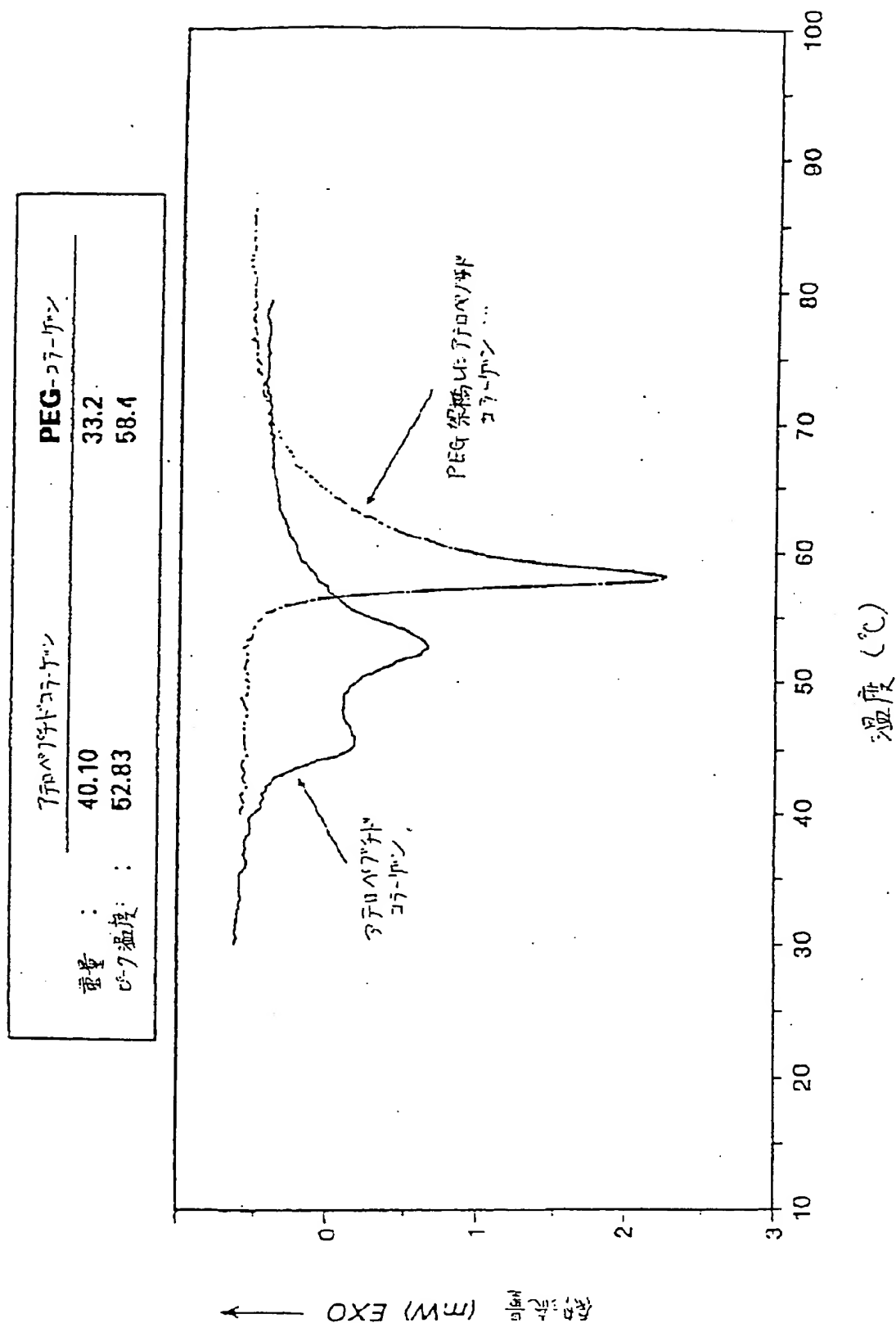


FIG.6

【 図 7 】

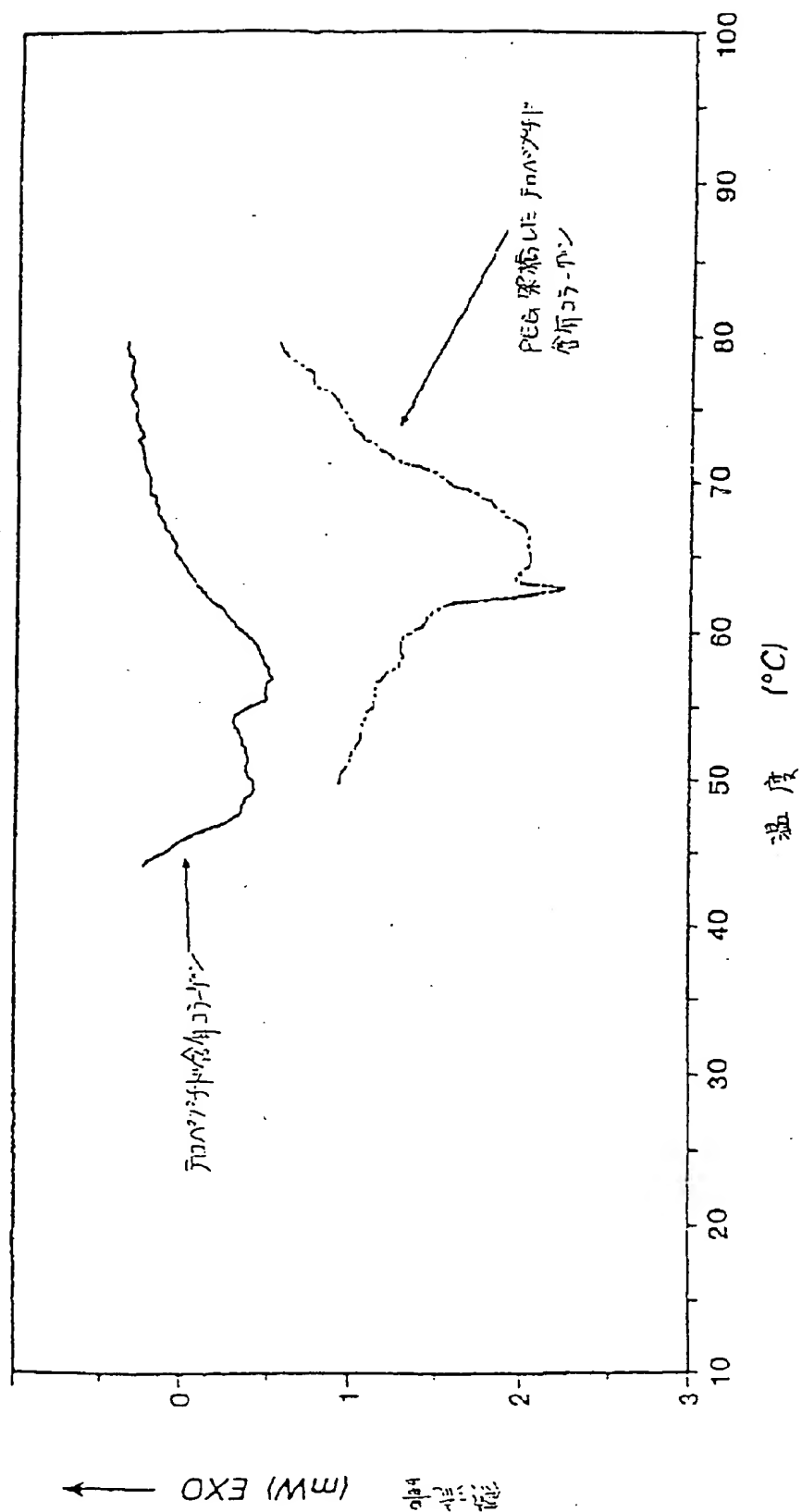


FIG.7

【 図 8 】

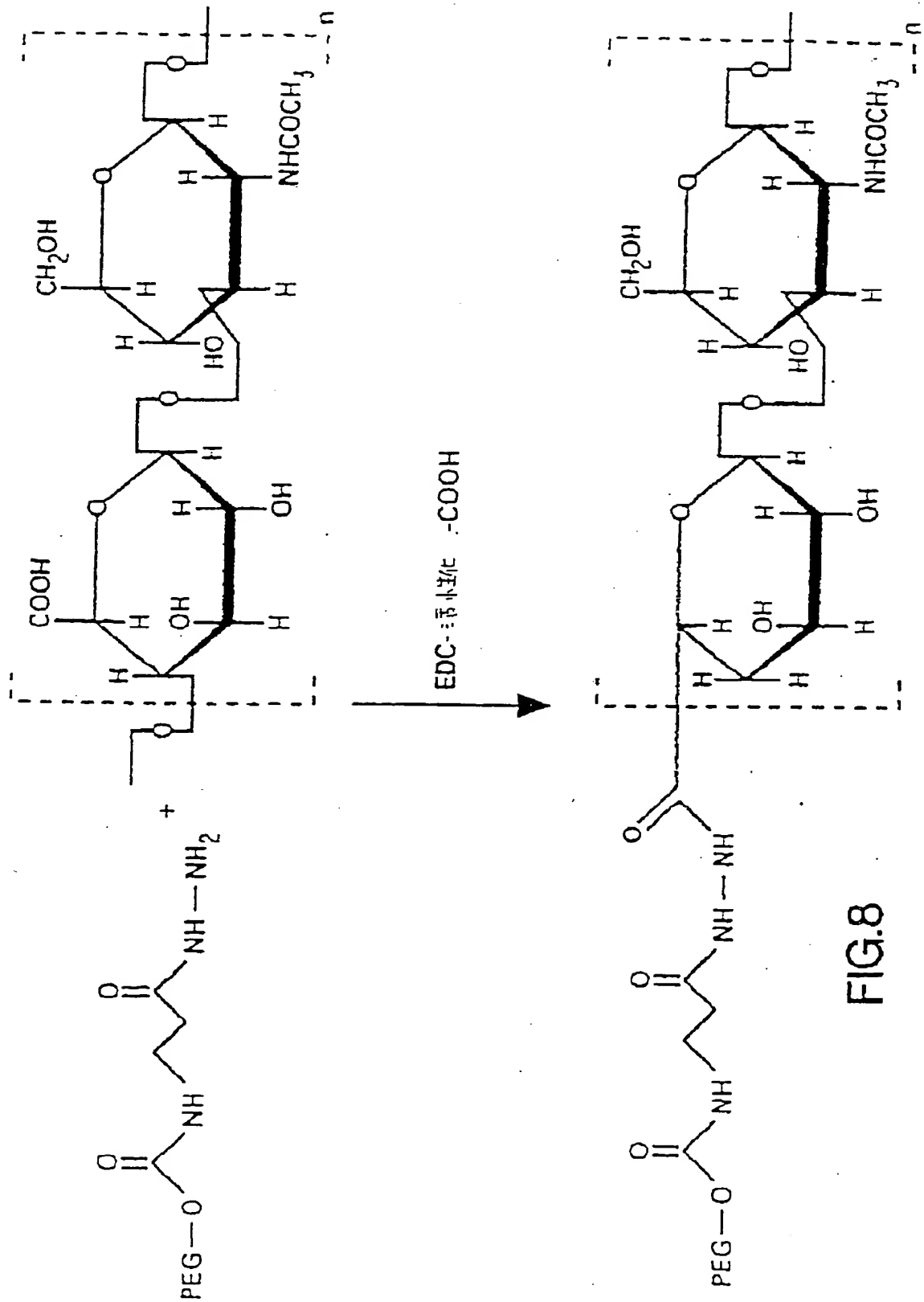


FIG.8

【図 9】

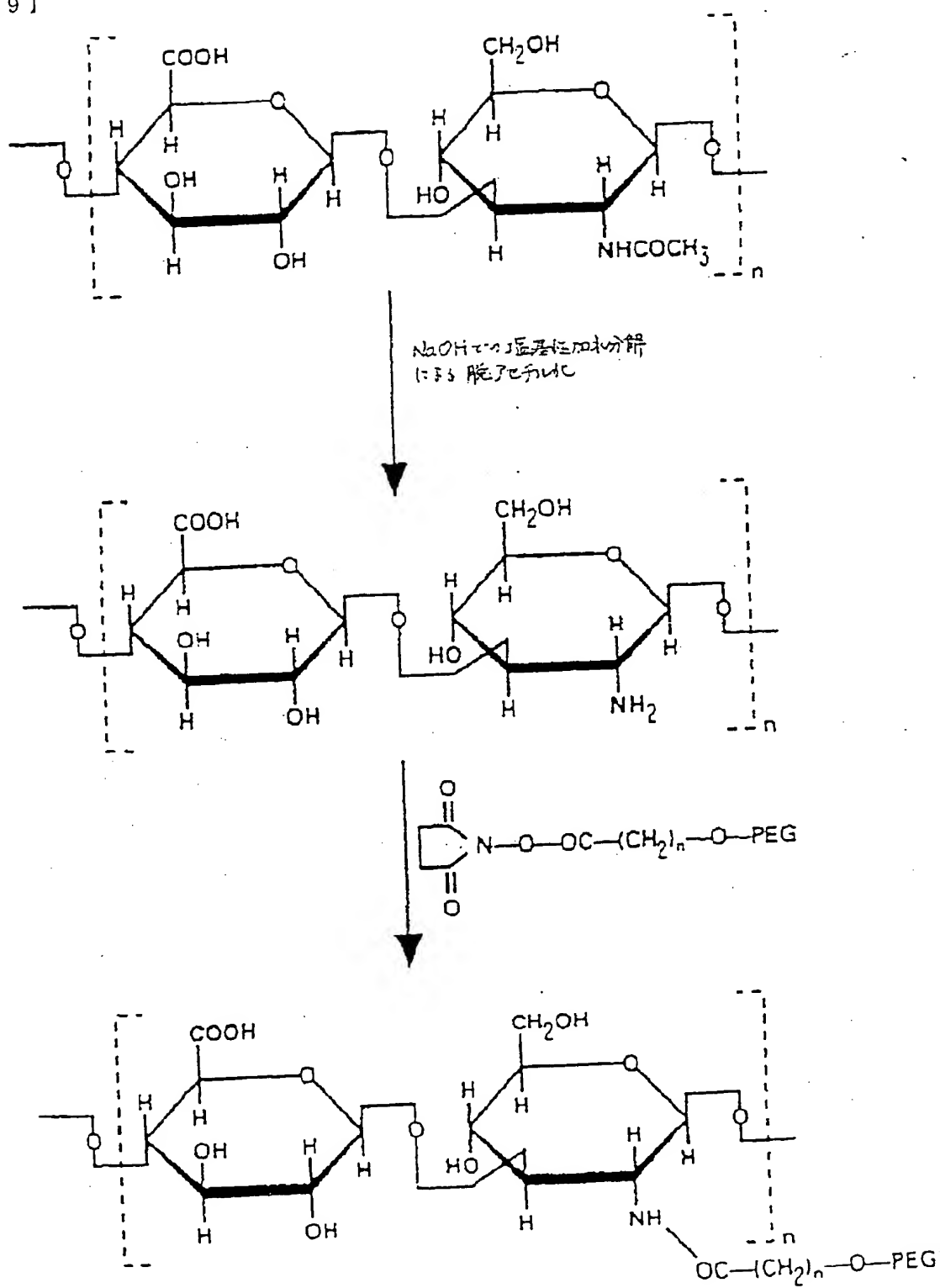
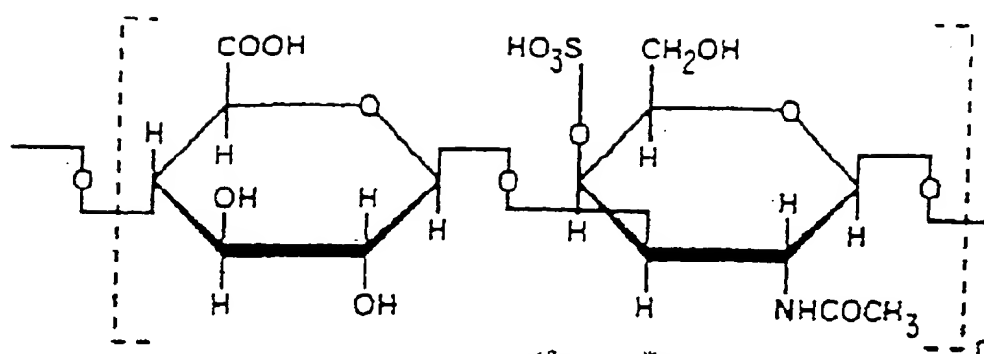
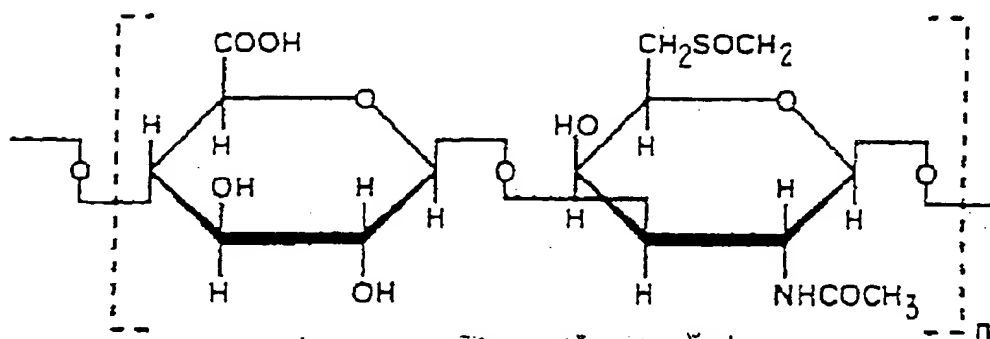


FIG.9

【図 10】



コンドロイチン硫酸 A の繰り返し単位



コンドロイチン硫酸 B の繰り返し単位

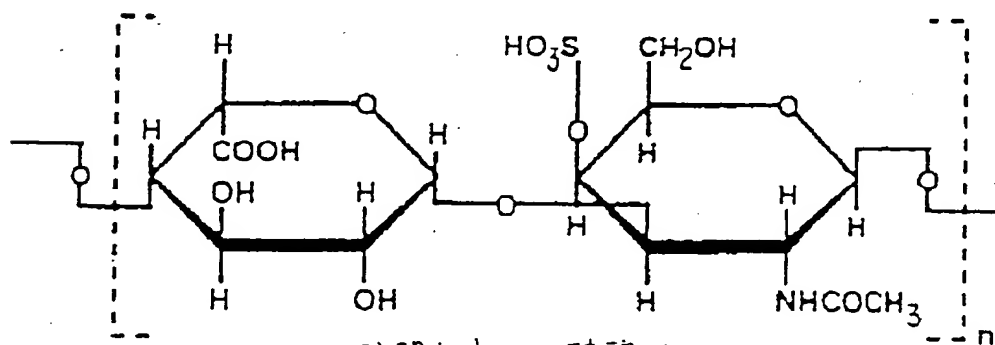
デヒドロキシコンドロイチン硫酸 (コンドロイチン硫酸 C) の
繰り返し単位

FIG. 10

【图11a】

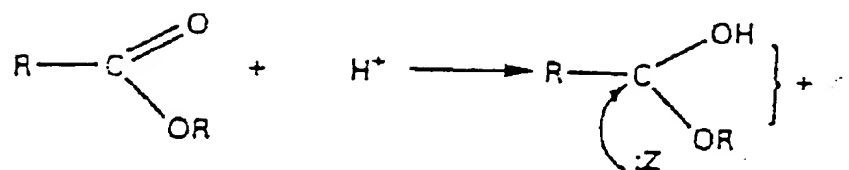
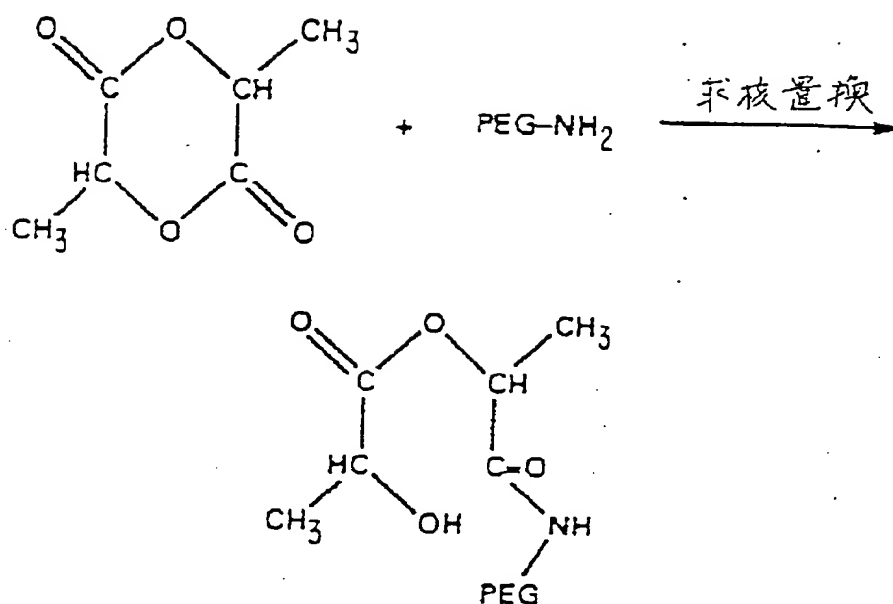
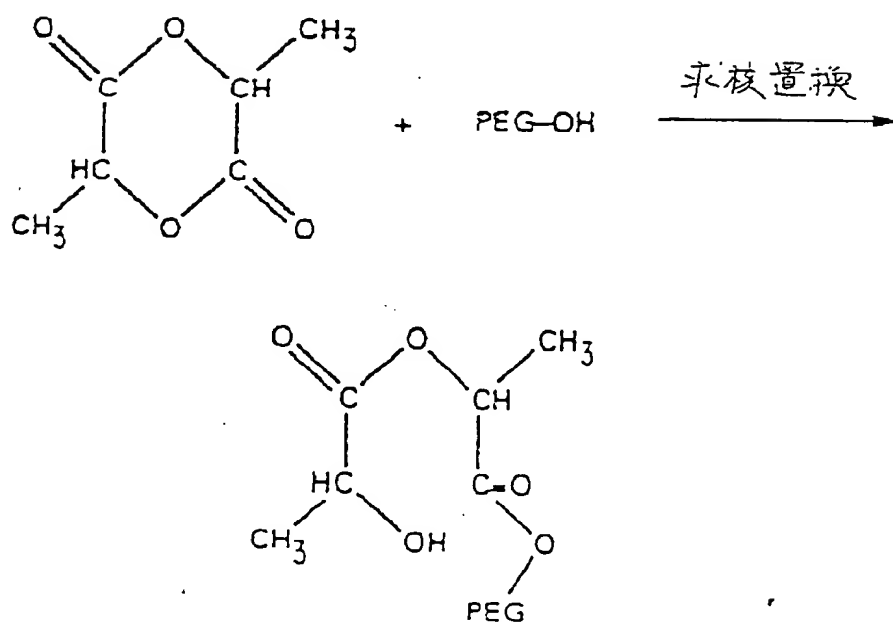


FIG.11a



【图11b】

FIG.11b

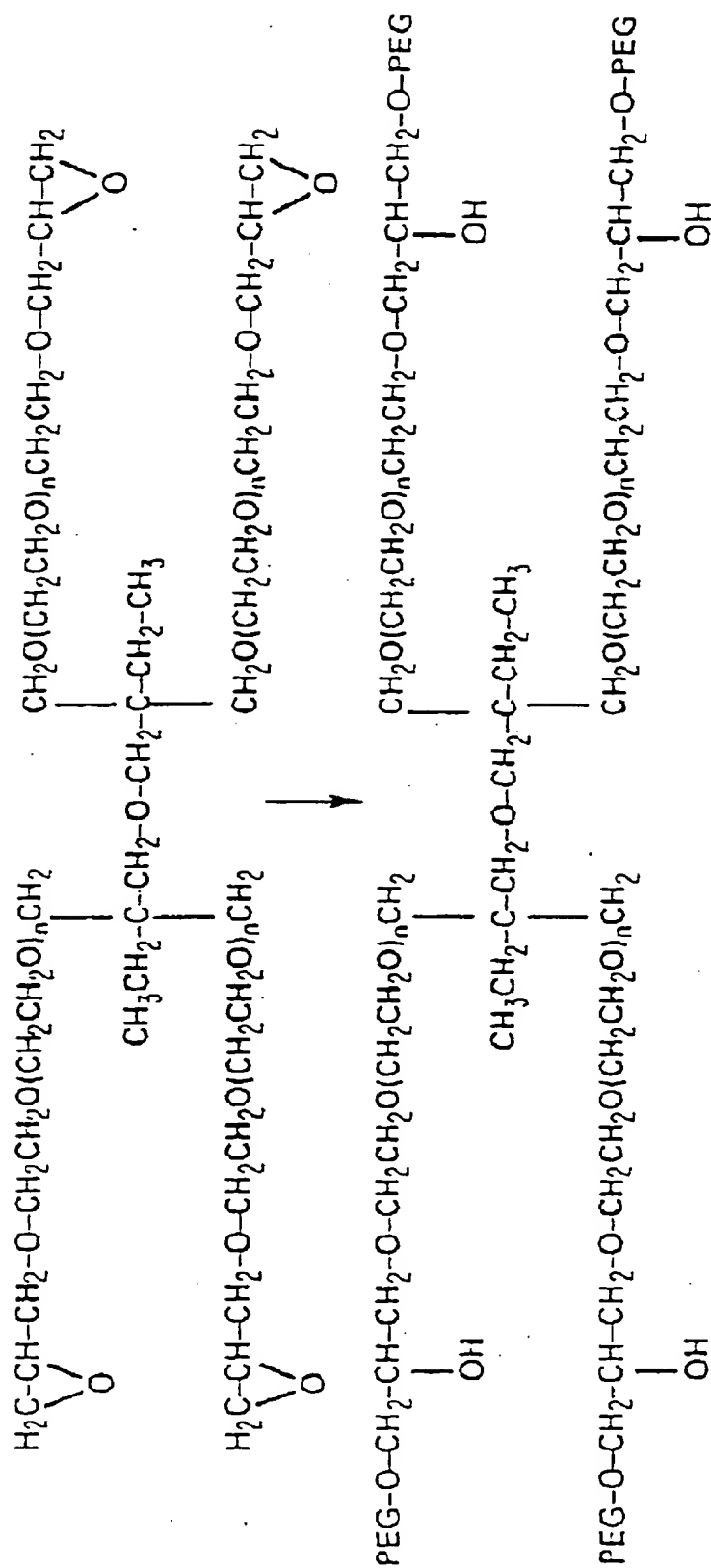


【图 1 2】

FIG.12

多官能性 E-PEG

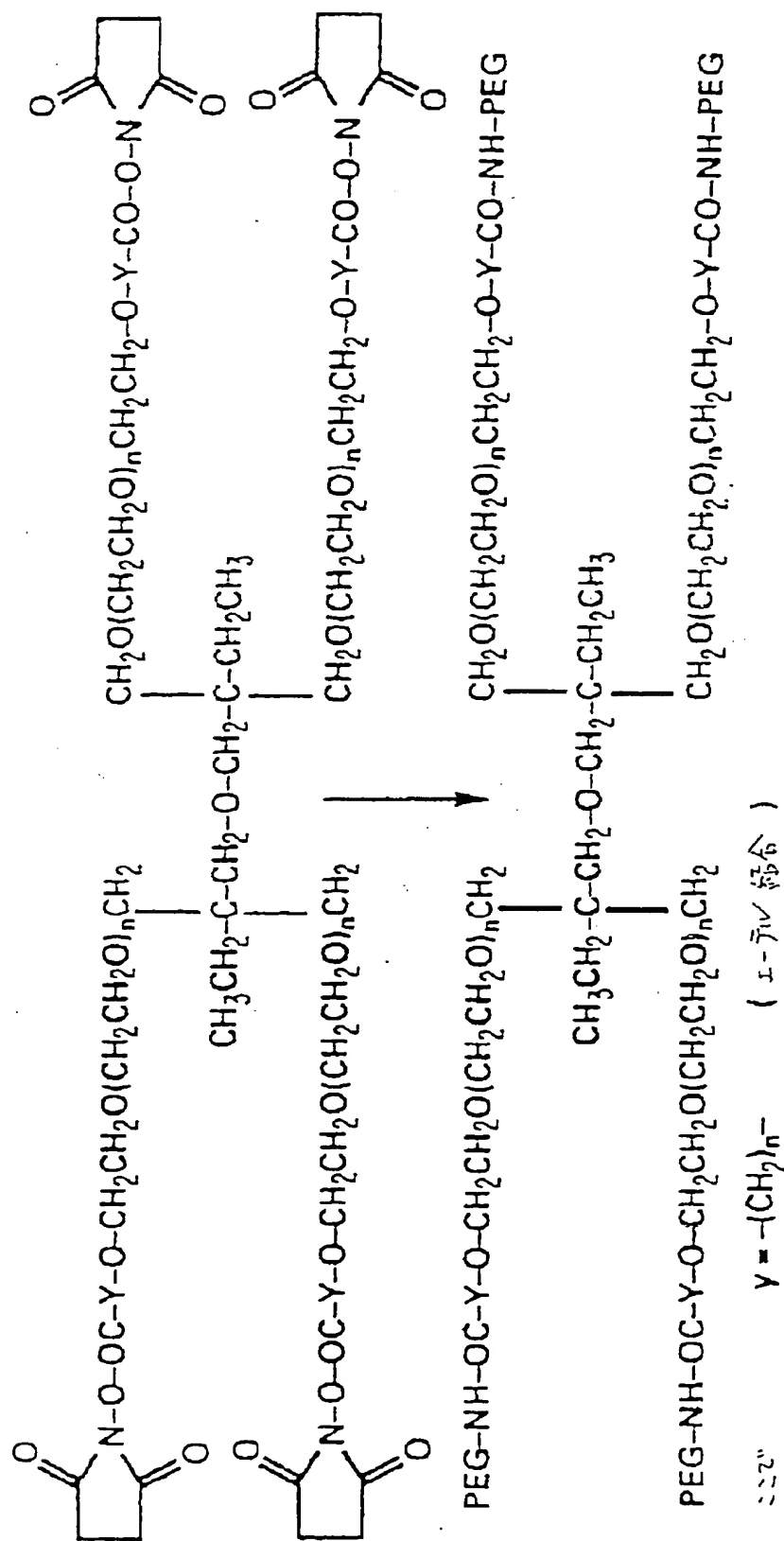
4 PEG-OH +

 $n = 0, 1, 2, 3, 4, 5$

[図 13]

多官能性 S-PEG

FIG.13

4 PEG-NH₂ +

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \end{array}$$

$$\text{Y} = \text{-C-(CH}_2\text{)}_n\text{-} \quad (\text{I, IV 符合})$$

$$n = 0, 1, 2, 3, 4, 5$$

FIG.14

サンプル*	直径 (mm)			厚さ (mm)			重量 (mg)		
	新鮮	脱水	再脱水	新鮮	脱水	再脱水	新鮮	脱水	再脱水
Z-I	0.9	0.30		30	25		0.0158	0.0015	
	2.5	0.46		30	25		0.129	0.0091	
Z-I+PEG	0.9	0.30	0.6	27	24	27	0.0175	0.0012	0.0139
	2.5	0.46	2.3	30	22	30	0.168	0.0101	0.1395

* Z-I = Zyderm® I. ジェル

【図 15】

FIG.15

サンプル	直径 (mm)	長さ (mm)	引張強度 (N)	引張応力 (N/mm ²)	Δ 長さ (mm)	伸び (ΔL/L)	ヤング率 (N/mm ²)
Z-I	0.30	20	1.0	14.9	1.0	0.0488	305
			2.0	30.3	1.4	0.0676	448
			1.0	14.9	1.0	0.0480	305
Z-I+PEG	0.30	20	6.5	127	7.7	0.3257	391
			6.0	112	6.5	0.2814	402
			6.5	131	8.5	0.3541	370
Z-I	0.46	20	18.2	121	2.0	0.0953	1264
			24.0	160	2.2	0.1040	1537
			8.0	51	1.2	0.0583	875
Z-I+PEG	0.46	20	29.0	223	5.5	0.2429	916
			26.0	198	5.4	0.2390	829
			25.5	197	5.6	0.2468	796

* Z-I = Zyderm[®]I コーティング

【 図 1 6 】

FIG.16

ファンル *	直径 (mm)		厚み (mm)		重量 (g)		
	新鮮	脱水	新鮮	脱水	新鮮	脱水	再脱水
Z-I+PEG	14	12	2.0	0.6	0.3213	0.0215	0.3048
Z-II+PEG	14	10	2.0	1.0	0.4111	0.0385	0.3943

* Z-I = Zyderm[®] I ジェルZ-II = Zyderm[®] II ジェル

【図 17】

FIG.17

材 料	引張強度 (N)	標準偏差	引張応力 (N/mm^2)	標準偏差	ひずみ ($\Delta L/L$)	標準偏差	ヤング率 ^c (N/mm^2)
アクリル ($n=3$)	0	0	0	0	0	0	0
アクリル ($n=3$)	0.67	0.21	0.051	0.017	0.414	0.020	0.122
アクリル-PEG ($n=3$)	1.17	0.15	0.072	0.010	0.210	0.009	0.342
アクリル-PEG ($n=3$)	2.00	0.10	0.165	0.018	0.497	0.082	0.335

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/06292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : C08G 63/48, 63/91; C08H 1/00; A61K 37/12

US CL : 525/54.1, 937; 523/113, 115; 530/356, 840

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 525/54.1, 937; 523/113, 115; 530/356, 840

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(RAMSHAW) ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol. 141, pages 361-365, published 1984 "Precipitation of Collagens by Polyethylene Glycols". Note the Abstract and page 361 under the section titled "Experimental Procedures."	1-3 4-8
Y	US, A, 4,495,285 (SHIMIZU) 22 JANUARY 1985. Note the Abstract and column 3, line 37 to column 6, line 2.	1, 2, 8
Y	US, A, 4,496,689 (MITRA) 29 JANUARY 1985. See the Abstract, column 5, line 6 to column 6, line 27, and the paragraph bridging column 7 to column 8.	1, 2, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	T	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	X*	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier documents published on or after the international filing date	Y*	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L documents which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	A*	document member of the same patent family
O documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

13 OCTOBER 1993

Date of mailing of the international search report

02 DEC 1993

 Name and mailing address of the ISA/US
 Commissioner of Patents and Trademarks
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

NATHAN M. NUTTER

Telephone No. (703) 308-2351

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/06292

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,847,325 (SHADLE) 11 JULY 1989. See the Abstract and column 4, lines 26-55. Also note column 4, line 59 to column 5, line 9 and column 12, lines 17-38.	1, 2, 8
A	US, A, 3,949,073 (DANIELS) 06 APRIL 1976. See the entire document.	1-8
A	US, A, 4,424,208 (WALLACE) 03 JANUARY 1984. See the entire document.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/06292

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

Group I. Claims 1-8 drawn to a conjugate of a natural polymer to a synthetic polymer classified in class 525, subclass 54.1.

Group II. Claims 9-11 drawn to a pharmaceutical composition classified in class 424, subclass 78.17.

Group III. Claims 12 and 25 drawn to an injectable pharmaceutical composition classified in class 514, subclasses vary.

Group IV. Claims 13-15 drawn to a pharmaceutical composition having a particulate material classified in class 424, subclass 489 plus.

Group V. Claim 16 drawn to a method of augmenting tissue classified in class 623, subclass 11 plus.

Group IV. Claims 17-19 drawn to a string classified in class 606, subclass 228.

Group VII. Claims 20-24 drawn to a tube classified in class 623, subclass 12.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 38/22			
C 0 8 G 65/32	N Q J	9272-4 J	
81/00	N U S	8416-4 J	
C 0 8 H 1/00	N V D	8215-4 J	
		9455-4 C	
		A 6 1 K 37/66	H
(31) 優先権主張番号	0 7 / 9 8 4, 9 3 3		
(32) 優先日	1992年12月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	0 7 / 9 8 4, 1 9 7		
(32) 優先日	1992年12月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	0 7 / 9 8 5, 6 8 0		
(32) 優先日	1992年12月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 0 2 5, 0 3 2		
(32) 優先日	1993年3月2日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, JP		
(72) 発明者	マイケルズ, アラン エス.		
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ		
	02167, チェスナット ヒル, アパートメ		
	ント 3エイ, アランデール ロード		
	210		
(72) 発明者	バーンズ, レイモン エイ., ジュニア		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94539,		
	フレモント, ベケイド プレイス 563		
(72) 発明者	フリース, ルイス		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024,		
	ロス アルトス, クレイ ドライブ 1684		
(72) 発明者	デラストロ, フランク		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002,		
	ベルモント, デコーベン アベニュー		
	2517		
(72) 発明者	ベンツ, ハンネ		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94560,		
	ニューアーク, トゥールーズ ストリート		
	36125		
(72) 発明者	マッカルラフ, キンバリー		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94544,		
	ハイワード, ナンバー124, クリアブルッ		
	ク サークル 29858		

(72)発明者 ダマニ, ラメシュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94041,
マウンテン ビュー, ナンバー223, ビラ
ストリート 1600

(72)発明者 バーグ, リチャード エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94024,
ロス アルトス, サウス スプリングー
ロード 660